



Etude des Particules Exopolymériques Transparentes (TEP) en milieu marin. Dynamique et rôle dans le cycle du carbone

Sophie Beauvais

► To cite this version:

Sophie Beauvais. Etude des Particules Exopolymériques Transparentes (TEP) en milieu marin. Dynamique et rôle dans le cycle du carbone. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2003. Français. NNT: . tel-00003711

HAL Id: tel-00003711

<https://theses.hal.science/tel-00003711>

Submitted on 5 Nov 2003

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI
Spécialité : Océanologie Biologique

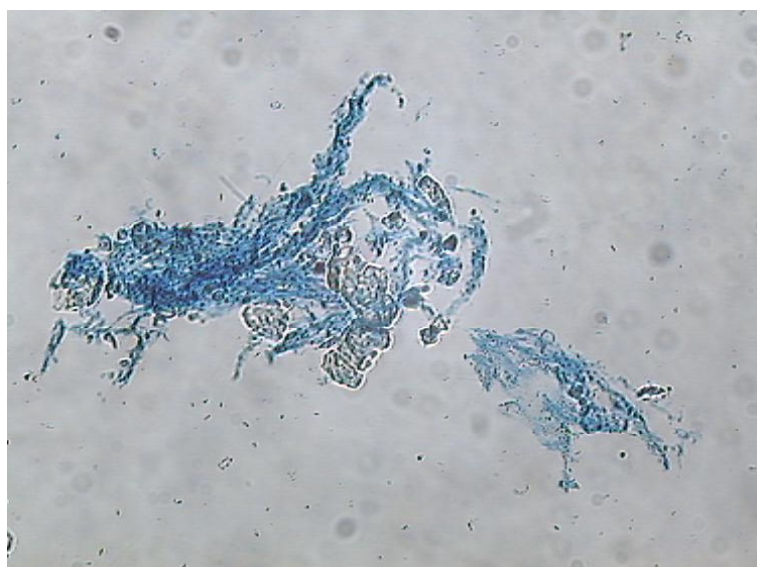


Présentée par **Sophie BEAUVAIS**

en vue d'obtenir le grade de *Docteur de l'Université Paris VI*

**ÉTUDE DES PARTICULES EXOPOLYMÉRIQUES TRANSPARENTES
(TEP) EN MILIEU MARIN.**

Dynamique et rôle dans le cycle du carbone



Soutenue le 12 septembre 2003, devant le jury composé de :

M. R. GALOIS - rapporteur

M. G-J. HERNDL

M. P. NIVAL

M^{me} M-L. PEDROTTI

M. F. RASSOULZADEGAN

M^{me} F. VAN WAMBEKE - rapporteur

Etude des Particules Exopolymériques Transparentes (TEP) en milieu marin.

Dynamique et rôle dans le cycle du carbone.

L'étude des Particules Exopolymériques Transparentes (TEP) fait l'objet d'une attention grandissante depuis les dix dernières années. Leur source principale est l'exsudation de polysaccharides par le phytoplancton et les bactéries. Ces particules formées de façon abiotique, principalement via la coagulation de matière organique colloïdale, sont fortement impliquées dans les processus biogéochimiques des milieux aquatiques.

Nous avons comparé deux techniques de mise en évidence des TEP (« Filter-Transfer-Freeze », et méthode des lames blanches dépolies) et évalué leurs limites et avantages afin d'établir un protocole le plus efficace possible. Dans la suite de ce travail, nous privilégierons la méthode des lames blanches dépolies qui offre de meilleurs résultats en termes de précision et de reproductibilité.

Une étude des variations saisonnières des TEP en Méditerranée Nord-Occidentale de février 1999 à février 2000 a été effectuée, en deux sites, l'un côtier, l'autre océanique (programme DYFAMED-JGOFS). Les TEP sont présentes en forte abondance durant la totalité de l'année (de 2×10^4 à 2×10^5 TEP ml^{-1}) en zone euphotique. Leur dynamique reflète davantage le statut trophique de l'écosystème plutôt que des différences régionales. Globalement, on observe une augmentation du pool de TEP après la floraison printanière et une persistance de ce pool durant la période estivale. Cette étude *in situ* a révélé également l'importance de ce pool de matière en tant que réservoir de carbone organique (de 0,6 à 20,5 $\mu\text{mol C l}^{-1}$; jusqu'à 15% du carbone organique total). De plus, ces particules possèdent un rapport molaire C/N largement supérieur au rapport de Redfield (C/N = 21 en moyenne). La formation des TEP serait une voie majeure de transfert du carbone lors de la surconsommation de carbone inorganique dissous (CID) par le phytoplancton en période oligotrophe. Les TEP représentent donc une composante importante dans le cycle du carbone en séquestrant le carbone organique sous forme particulaire.

L'effet des conditions trophiques, associées à différentes intensités de turbulence sur la dynamique des TEP a fait l'objet d'un suivi en milieu contrôlé, dans le cadre du projet européen NTAP (Nutrient dynamics mediated through Turbulence And Plankton interactions). Une forte turbulence ($1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-3}$) induit la persistance de ce pool en surface entraînant l'agrégation des particules. Elle favorise également la colonisation bactérienne des TEP. L'hydrodynamisme de l'écosystème influencera donc la formation des TEP ainsi que le devenir de ce pool de matière (accumulation et/ou sédimentation).

L'utilisation de la microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X a permis de déterminer la composition élémentaire (C, N, P, Mg, Ca, Fe, Mn) des TEP en fonction des conditions trophiques du milieu. Les résultats confirment l'importance de ces particules en termes de carbone et leur rôle dans la surconsommation de CID lorsque le milieu est déficient en azote. De plus, les TEP adsorbent du fer et du manganèse (jusqu'à 1,7 nM Mn et 18,7 nM Fe dans un fjord Norvégien) laissant présumer de leur rôle dans le cycle biogéochimique des éléments-traces.

Mots-clefs : Particules Exopolymériques Transparentes – TEP – Matières organiques particulaire et dissoute – MOP – MOD – Sels nutritifs – Hydrodynamisme – Méditerranée Nord-Occidentale – Cycle du carbone – Biogéochimie

Study of Transparent Exopolymeric Particles (TEP) in the marine environment.**Dynamics and role within the carbon cycle.**

The study of Transparent Exopolymeric Particles (TEP) has been a field of increasing interest over the past ten years. Their main source is exsudation of polysaccharides by phytoplankton and bacteria. These particles, which are formed abiotically, essentially by coagulation of colloidal organic matter, are strongly involved in marine biogeochemical processes.

Two techniques for determining the presence of TEP were compared (“Filter-Transfer-Freeze” and “Frosted White Slides”) and their limits and advantages were evaluated in order to establish an optimal procedure. In the following work, the second method was preferred for its better results in terms of precision and accuracy.

A study of the seasonal variations of TEP in the North-western Mediterranean from February 1999 to February 2000 was carried out at two sites, one being at the coast and the other offshore (DYFAMED-JGOFS program). The TEP remained very abundant during the whole year (from 2.10^4 to 2.10^5 TEP ml^{-1}) in the euphotic zone. Their dynamics tended to reflect the trophic status of the ecosystem rather than the regional differences. Generally, an increase of the TEP pool was observed after the spring bloom, persisting during the summer period. The present *in situ* study also revealed the importance of this pool of matter as a stock of organic carbon (from 0.6 to 20.5 $\mu\text{mol.C.l}^{-1}$; up to 15% of total organic carbon). Furthermore, these particles have a C/N molar ratio which is significantly greater than the Redfield ratio (C/N = 21 in average). The formation of TEP would therefore have a major role in the transfer of carbon when over-consumption of dissolved inorganic carbon (DIC) by phytoplankton during oligotrophic conditions takes place. TEP consequently represent an important component in the carbon cycle by trapping organic carbon in a particulate form.

The effect of the trophic regime associated to different degrees of turbulence on the dynamics of TEP has been monitored in controlled conditions, under the European project NTAP (Nutrient dynamics mediated through Turbulence And Plankton interactions). This showed that strong turbulence ($1.10^{-4}\text{cm}^2\text{s}^{-3}$) enhances the persistence of this pool at the surface by encouraging the aggregation of particles. It is equally favourable towards bacterial colonisation of TEP. Hence, the hydrodynamics of the ecosystem should be able to influence the formation of TEP as well as the outcome of this pool of matter (accumulation and/or sedimentation).

Transmission electronic microscopy coupled to an X-ray micro-analysis was applied to determine the elementary composition (C, N, P, Mg, Ca, Fe, Mn) of TEP as a function of the trophic conditions. Results confirmed the importance of these particles in terms of carbon as well as their role in the over-consumption of DIC when the environment is nitrogen-deficient. Furthermore, TEP are able to adsorb iron and manganese (up to 1.7 nM Mn and 18.7 nM Fe in a Norwegian fjord), thus pointing to their role in the biogeochemical cycle of trace elements.

Keywords: Transparent Exopolymeric Particles – TEP – Particulate and Dissolved Organic Matter – POM – DOM – Nutrients – Hydrodynamics – North-western Mediterranean – Carbon cycle – Biogeochemistry

- Avant-propos -

« Le Savoir est de beaucoup la part la plus considérable du Bonheur » (Sophocle).

Si ces mots sont justes, alors cette thèse m'aura permis de tendre vers le Bonheur. Je ne prétends pas avoir acquis le Savoir bien entendu, mais durant ces années, j'ai beaucoup appris, sur la science, mais aussi sur moi-même. La thèse est une merveilleuse aventure, tant scientifique qu'humaine. Qui dit aventure, dit embûches et doutes bien sûr, mais surtout émerveillements, surprises et découvertes. C'est pourquoi, je tiens à remercier par ces quelques lignes, toutes les personnes qui m'ont permis d'une manière ou d'une autre, de participer à cette épopée fabuleuse.

*Ce travail s'inscrit dans une réflexion pluridisciplinaire et collective qui au delà de l'enrichissement scientifique qu'elle procure, offre les conditions d'une recherche motivante, gratifiante et conviviale. Pour toutes ces raisons, je remercie le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV), en particulier son directeur **Louis LEGENDRE**, qui contribue grandement au dynamisme et à la qualité scientifique de ce laboratoire. Je remercie également l'équipe « Diversité, Biogéochimie et Ecologie Microbienne », son animateur, **Jean-Pierre GATTUSO** ainsi que **l'ensemble des membres de l'équipe**, qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, tant scientifiques qu'humaines. Ce travail a en outre, bénéficié d'un contexte matériel et logistique favorable, grâce à différentes sources de financements : une allocation de recherche décernée par le Ministère de la Recherche et de la Technologie, une action thématique innovante (ATI) attribuée à **Rodolphe Lemée**, et divers financements issus du projet européen NTAP (Nutrient dynamics mediated through Turbulence And Plankton interaction) et du projet DYFAMED-PROOF-JGOFS (France).*

*Toute ma considération se tourne en premier lieu vers le Professeur **Paul NIVAL**. Grâce à son charisme et à sa connaissance immense des sciences océanographiques, il nous a offert des enseignements passionnants à l'Université Pierre & Marie Curie, qui ont rendu ces années universitaires, inoubliables. Je le remercie enfin vivement pour la confiance qu'il a bien voulu me témoigner en me permettant de poursuivre en troisième cycle.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, dont **France VAN WAMBEKE**, **Robert GALOIS** et **Gerhard HERDNL**, qui ont bien voulu consacrer du temps à la lecture et à l'examen de ce travail de recherche.*

*J'adresse toute ma gratitude à **Maria-Luiza PEDROTTI** qui m'a guidé avec enthousiasme et passion dans mes recherches. Je lui suis également très reconnaissante de la confiance qu'elle m'a témoigné aussi bien au quotidien qu'en m'ouvrant les portes de la recherche européenne en me permettant de collaborer à l'étranger et de participer à des conférences de grande renommée. J'ai pu ainsi découvrir d'autres visions de la science, ce qui me fut très enrichissant. Grâce à l'écoute et au dialogue dont elle a su faire preuve à mon égard, j'ai le sentiment d'avoir vécu une véritable collaboration, c'est pourquoi je lui adresse ici ma très vive gratitude et ma très sincère reconnaissance.*

*Je remercie également **Fereidoun RASSOULZADEGAN** qui m'a suivi pas à pas dans mon travail, qui a su, par des métaphores dont lui seul a le secret, m'initier aux mystères du réseau trophique microbien. Ses conseils et ses enseignements m'ont permis de prendre du recul et d'acquérir ainsi, une vision plus globale de mon sujet de recherche.*

*Mon travail au sein de ce laboratoire, n'aurait pu aboutir sans l'aide d'un certain nombre de personnes, que je voudrais chaleureusement remercier. Tout d'abord, un grand merci à **Rodolphe LEMÉE**, pour les nombreuses discussions, pour ses conseils avisés, pour nos collaborations fructueuses. Merci à **Serge DALLOT** pour son aide considérable concernant les analyses statistiques. Merci à **Erica VILLA** pour son aide immense tant sur un plan scientifique qu'amical. Merci à **Xavier MARI** pour m'avoir fait partager ses connaissances sans bornes sur ce monde mystérieux et invisible que représentent les Particules Exopolymériques Transparentes ! Merci à **Marie-Dominique PIZAY**, une autre chit'i, pour les données de sels nutritifs. Merci à **Agnès STOCK** qui a assuré avec brio les campagnes à DYFAMED et à **l'équipage du***

Thétys pour sa bonne humeur et son professionnalisme. Merci à **Jean-Yves CARVAL**, qui n'est pas un « marin d'eau douce! », pour les campagnes, par tous les temps, au Point B. Merci à **Michelle ETIENNE**, **Isabelle COURTOIS** et **Martine FIORONI**, pour leur assistance, pour leur efficacité, leur patience et toujours dans la bonne humeur !

Un certain nombre de collaborations durant ce travail m'a permis d'enrichir mes connaissances et de m'ouvrir à d'autres horizons scientifiques. Je remercie pour cela les italiennes, **Serena FONDA-UMANI** et **Rossela AMODIO**, les espagnols, **Celia MARRASE**, **Francesc PETERS**, **Monse VIDAL** et **Miquel ALCARAZ** et les nordiques, **Mikael HELDAL**, **Frede THINGSTAD**, **Egil ERICHSEN**, **Svein NORLAND**, **Jorrun EGGE** et **Harry HAVSKUM**.

Enfin cette aventure de trois ans, ne serait pas ce qu'elle est, sans ces rencontres étonnantes, sans cette ambiance internationale si propre à Villefranche. Des amitiés y sont nées : **Lies**, un grand merci sans retenues pour tout ce bonheur partagé, pour ces montées fiévreuses d'une maladie étrange « la connerie », **Fredo**, **Bobo**, **Victor**, **Annes-So** et **Caro**, merci pour votre générosité, votre gentillesse et pour tous ces fous-rires ! Des liens se sont créés, merci à vous : **Valou**, **Juanito**, **Rado**, **Emilie**, **Manu**, **Cécile**, **Francis**, **Flav**, **Eric**, **Fred** et les cailloutologues **David**, **Laure**, et **Yves**.

Et Villefranche ne serait pas Villefranche sans l'ambiance si particulière du port de la Darse, où charpentiers, ébénistes, mécaniciens et skippers côtoient les scientifiques, autour d'une même passion, la Mer. Toute une bande de joyeux lurons ont égayé mes week-ends autour d'une autre aventure, celle de « *Laïssa Ana* ». Je pense ici à **Franck**, **Lolo**, **Dan**, **Totophe**, **Cécile**, **Xavier**, **Patoche** et les autres. Merci à vous pour m'avoir fait découvrir un autre monde, celui de l'artisanat, où, comme en Sciences, la créativité et la réflexion donnent naissance à de belles et grandes choses !

Enfin, un immense merci à **mes si chers parents**, je n'aurais pu réaliser cette thèse sans leur soutien et leur amour. Et pour finir, un merci particulier à **Damien**, lui seul sait tout ce que je lui dois.

Je dédie ce travail de thèse au Professeur **Alain RICHARD**, avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche océanographique, il y a ... presque 10 ans déjà! et qui plus est, dans ma chère terre natale, le Pas-de-Calais ! Il m'a témoigné une grande confiance et m'a initié au monde océanographique en testant ma motivation par des plongées dans les eaux sombres et froides du port de Boulogne-sur-Mer ! Si j'écris aujourd'hui ces quelques lignes de remerciements témoignant de l'aboutissement de mon travail de thèse, c'est probablement un peu grâce à lui.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	----------

Chapitre I

COMPARAISON DE DEUX METHODES DE MISE EN EVIDENCE DES PARTICULES EXOPOLYMERIQUES TRANSPARENTES (TEP)	7
--	----------

A. INTRODUCTION	9
B. MATERIELS & METHODES	11
1. Échantillonnage	11
a) Sites de prélèvement	11
b) Méthode de prélèvement	14
2. Filtration et coloration	14
3. Préparation des lames	16
a) Méthode du Filter-Transfer-Freeze (FTF)	16
b) Méthode dite « des lames blanches dépolies » (LBD)	16
4. Témoins	17
5. Observation des TEP, énumération et mesure de la taille	17
6. Distribution de taille des TEP	19
7. Analyses statistiques	20
C. RESULTATS	22
1. Abondance	22
a) En fonction du volume filtré	22
b) En fonction de la méthode utilisée	24
2. Concentration volumique	25
a) En fonction du volume filtré	25
b) En fonction de la méthode utilisée	28
3. Distributions de taille	28
4. Observation des lames et morphologie des TEP	32
D. DISCUSSION	34
1. La coloration au bleu Alcian	34
2. Observation et comptage	34
3. Comparaison des deux méthodes utilisées lors de cette étude	35
4. Autres approches méthodologiques	38
5. Conclusion	39

Chapitre II

DISTRIBUTION SAISONNIERE DES TEP EN MEDITERRANEE NORD-OCCIDENTALE. RELATIONS AVEC LES CONDITIONS TROPHIQUES ET HYDROLOGIQUES	41
---	-----------

A. INTRODUCTION	43
B. MATERIELS & METHODES	44
1. Sites d'étude	44
2. Echantillonnages	45
3. Mise en évidence des TEP	46
4. Distribution de taille des TEP	46
C. RESULTATS	47
1. Caractéristiques hydrologiques de la colonne d'eau	47
a) Site DYFAMED	47
b) Point B	47
2. Distribution saisonnière des TEP	49

3. Distribution de taille des TEP	52
D. DISCUSSION	54
1. Comparaisons avec d'autres sites	54
2. Comparaisons entre le site côtier et le site océanique	54
3. Processus gouvernant la dynamique des TEP à DYFAMED	56
a) Origines du pool de TEP	56
b) Pourquoi y a-t-il accumulation de TEP durant la période estivale et quelles en sont les conséquences ?	58
c) Quel est le devenir du pool de TEP ?	60
4. Conclusion	60

Chapitre III

ROLE DES TEP DANS LA SURCONSOMMATION DE CARBONE INORGANIQUE DISSOUS PAR LE PHYTOPLANCTON. IMPACT SUR LE FLUX DE CARBONE 63

A. INTRODUCTION	65
B. MATERIELS & METHODES	68
1. Estimation du rapport C/N des TEP	68
a) Principe	68
b) Protocole expérimental	70
c) Echantillonnage et filtration	70
d) Mesure du rapport C/N des TEP	71
2. Estimation des différents pools de carbone organique : TEP, COD, et COP	72
C. RESULTATS	74
1. Rapport C/N des TEP	74
2. Contribution des TEP au pool de carbone organique	75
D. DISCUSSION	78
1. Formation des TEP par la méthode de bullage	78
2. Contribution des TEP au stock de carbone organique	79
3. Rôle des TEP dans la surconsommation de carbone par le phytoplancton	81
4. Conclusion	84

Chapitre IV

EFFET DES CONDITIONS TROPHIQUES ET DE LA TURBULENCE SUR LA DYNAMIQUE DES PARTICULES EXOPOLYMERIQUES TRANSPARENTES. ETUDE EN MESOCOSMES 85

A. INTRODUCTION	87
B. MATERIELS & METHODES	91
1. Protocole expérimental	91
2. Mise en évidence et comptages des TEP	93
3. Mesures du carbone et de l'azote organiques particulières	93
4. Production de TEP	94
5. Bactéries agrégées aux TEP	94
a) Préparation des échantillons	94
b) Observation et énumération des bactéries liées aux TEP	94
c) Bactéries agrégées en fonction de la taille des TEP	96
6. Autres paramètres	97
C. RESULTATS	98
1. Nutriments et biomasse phytoplanctonique	98
a) Conditions initiales	98
b) Mésocosmes non enrichis en sels nutritifs (T0 à T4)	98
c) Mésocosmes enrichis (NT0 à NT4)	100
2. Dynamique des TEP	101

3. <i>Dynamiques du carbone et de l'azote</i>	103
4. <i>Effet de la turbulence sur la dynamique des TEP</i>	106
a) <i>Effet de la turbulence sur la production et la sédimentation des TEP</i>	106
b) <i>Effet de la turbulence sur la distribution de taille des TEP</i>	108
5. <i>Impact de la turbulence sur les relations TEP/bactéries</i>	111
D. DISCUSSION	116
1. <i>Source des TEP</i>	116
2. <i>Facteurs influençant la formation des TEP</i>	117
a) <i>Influence des conditions trophiques</i>	117
b) <i>Influence de la turbulence</i>	118
3. <i>Dynamiques du carbone et de l'azote</i>	118
4. <i>Effet de la turbulence sur l'agrégation et la sédimentation des TEP</i>	120
5. <i>Colonisation bactérienne des TEP</i>	123
a) <i>Colonisation en fonction de la taille des TEP</i>	123
b) <i>Rôle des TEP en tant que micro-niche</i>	123
c) <i>Effet des conditions trophiques et de la turbulence sur la colonisation bactérienne</i>	124
6. <i>Conclusion</i>	125

Chapitre V

COMPOSITION ELEMENTAIRE DES PARTICULES EXOPOLYMERIQUES TRANSPARENTES EN FONCTION DES CONDITIONS TROPHIQUES.	127
A. INTRODUCTION	129
B. MATERIELS & METHODES.....	131
1. <i>Prélèvement et préparation des échantillons</i>	131
2. <i>Composition élémentaire des particules organiques non vivantes</i>	133
a) <i>Principe du MET-rayons X</i>	133
b) <i>Analyse de la matière organique particulaire non vivante</i>	133
3. <i>Rapports C/N, C/P et N/P</i>	134
4. <i>Estimation de la concentration en éléments liés aux TEP</i>	135
a) <i>Dans l'eau de mer naturelle (jour 0)</i>	135
b) <i>Le cas particulier du carbone</i>	135
C. RESULTATS	137
1. <i>Composition élémentaire des particules organiques</i>	137
2. <i>Rapports C/N, C/P et N/P des particules organiques</i>	141
3. <i>Contribution des TEP au cycle biogéochimique des éléments</i>	145
a) <i>Dans l'eau de mer naturelle</i>	145
b) <i>Cas particulier du carbone</i>	146
D. DISCUSSION	148
1. <i>La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X : une nouvelle approche pour l'étude des Particules Exopolymériques Transparentes</i>	148
2. <i>Contribution des TEP aux cycles du carbone, de l'azote et du phosphore</i>	149
a) <i>Rôle des TEP dans la surconsommation de CID</i>	149
b) <i>Régulation du rapport C/N des TEP</i>	150
c) <i>Origines de l'azote et du phosphore des TEP</i>	151
3. <i>Contribution des TEP dans le cycle des métaux-traces</i>	152
4. <i>Conclusion</i>	154
CONCLUSION & PERSPECTIVES	155
BIBLIOGRAPHIE	163
ANNEXES	175

Table des Illustrations

Introduction générale

Figure 1 : Concept du réseau trophique en milieu pélagique, mettant en exergue l'importance de la boucle microbienne comme voie majeure pour les flux de matière organique.	1
Figure 2 : Concept de la formation abiotique des particules exopolymériques transparentes (TEP) à partir de leurs précurseurs.	3
Figure 3 : Origine et mode de formation des particules exopolymériques transparentes.	3
Figure 4 : Changements dans les concepts concernant les flux de carbone entre organismes et particules non vivantes, illustrant la chaîne alimentaire linéaire, la boucle microbienne et un nouveau réseau basé sur les processus d'agrégation.	4

Chapitre I

Figure I-1 : Site d'échantillonnage dans le bassin Adriatique nord.	11
Figure I-2 : Distributions mensuelles moyennes des concentrations en chlorophylle a, en surface en Mer Adriatique.	12
Figure I-3 : Site d'échantillonnage dans Raunefjorden, en Mer du Nord.	13
Figure I-4 : Zone d'étude en Méditerranée Nord-Occidentale. L'échantillonnage a été effectué au Site DYFAMED.	13
Figure I-5 : Matériel et méthodes utilisés pour la filtration, la coloration des TEP et la préparation des lames en vue d'une observation au microscope.	15
Figure I-6 : Matériels et méthodes utilisés pour l'observation, le dénombrement et la mesure des TEP.	18
Figure I-7 : Distribution de taille théorique des TEP.	20
Figure I-8 : Abondance en TEP en fonction du volume filtré selon la méthode « FTF » et selon la méthode « LBD » au site côtier (a) dans le fjord (b) et au site océanique (c).	23
Figure I-9 : Abondances en TEP selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ».	24
Figure I-10 : Efficacité de transfert des TEP, depuis le filtre vers la lame, en fonction de la taille des particules.	25
Figure I-11 : Concentration volumique des TEP en fonction du volume filtré selon la méthode « FTF » et selon la méthode « LBD » au site côtier (a) dans le fjord (b) et au site océanique (c).	26
Figure I-12 : Fraction volumique des TEP selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ».	28
Figure I-13 : Exemples de spectre de taille des TEP : au site côtier en appliquant la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (à gauche) et en utilisant la méthode des lames blanches dépolies (à droite) dans un même échantillon.	29
Figure I-14 : Pentas des spectres de taille selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ».	29
Figure I-15 : Classification hiérarchique basée sur la méthode du plus proche voisin. La distance métrique est la distance euclidienne.	30
Figure I-16 : Contribution des 4 principales classes de taille des TEP (%) aux 3 sites en fonction du volume filtré (3, 5, 10 et 20 ml) et selon les deux méthodes (FTF et LBD).	31
Figure I-17 : Photographies des TEP mises en évidence selon la méthode du FTF et selon la méthode des lames blanches dépolies.	33

Chapitre II

Figure II-1 : Sites d'échantillonnages (Point B et DYFAMED).	45
Figure II-2 : Variations saisonnières de la température (a, b), des nitrates (c, d) et de la chlorophylle a (e, f).	48
Figure II-3 : Variations saisonnières de l'abondance en TEP et de leur concentration volumique de février 1999 à février 2000, à DYFAMED et au Point B.	49
Figure II-4 : Abondance en TEP en fonction de la concentration en chlorophylle a, à DYFAMED et au Point B sur la totalité de l'année, à la profondeur du maximum de chlorophylle a (DCM).	50
Figure II-5 : Représentation tri-dimensionnelle de la concentration volumique en TEP en fonction de leur diamètre de sphère équivalente durant l'année d'étude, à DYFAMED (a) et au Point B (b), à la profondeur du maximum de chlorophylle a.	51
Figure II-6 : Spectres de taille des TEP issus de l'analyse de covariance.	52
Figure II-7 : Spectres de taille des TEP après transformation log-log, à DYFAMED et au Point B.	53
Figure II-8 : Concentrations en pigments biomarqueurs de groupes phytoplanctoniques au site DYFAMED, de 1997 à 1999, de 0 à 250 m de profondeur.	56
Figure II-9 : Distribution du carbone organique dissous sur les 200 premiers mètres de la colonne d'eau à DYFAMED durant une année théorique.	58
Figure II-10 : Rapports nitrates/phosphates à DYFAMED de 0 à 2000 m de profondeur.	59

Chapitre III

Figure III-1 : Représentation schématique de la problématique de cette étude, à savoir : quel est le rôle des TEP dans la surconsommation de CID par le phytoplancton ?	67
Figure III-2 : Formation d'agrégats par le processus de coagulation de surface et protocole utilisé lors de la méthode de bullage.	69
Figure III-3 : Exemples de spectres de taille des TEP échantillonnées dans la colonne après 1h et 3h de bullage.	71
Figure III-4 : Variations saisonnières du rapport molaire C/N des TEP à DYFAMED et au Point B de février 1999 à février 2000 à la profondeur du maximum de chlorophylle a.	74
Figure III-5 : Variations saisonnières de la concentration en carbone lié aux TEP et des nitrates à la profondeur du maximum de chlorophylle a.	75
Figure III-6 : Variations saisonnières de la concentration en carbone lié aux TEP et de la production primaire à DYFAMED, à la profondeur du maximum de chlorophylle a, de février 1999 à janvier 2000.	76
Figure III-7 : Taux d'assimilation du carbone par unité de chlorophylle a sur les 100 premiers mètres de la colonne d'eau à DYFAMED de 1997 à 1999.	82
Figure III-8 : Schéma conceptuel illustrant la surconsommation de CID par rapport à l'azote par le phytoplancton, d'avril à juin à DYFAMED.	83

Chapitre IV

Figure IV-1 : Gammes de tailles typiques d'organismes appartenant à différents niveaux trophiques (barres noires), associées à leurs concentrations observées dans le milieu naturel (barres grises). Au bas de la figure est illustrée l'échelle de Kolmogorov typique des océans.	88
Figure IV-2 : Schéma explicatif du protocole de visualisation simultanée des bactéries et des TEP.	95
Figure IV-3 : a) Bactéries observées sous lumière UV b) TEP observées sous lumière transmise c) Résultat de la superposition des deux photographies.	95

Figure IV-4 : Variations temporelles des concentrations en sels nutritifs et en chlorophylle a dans les mésocosmes non enrichis et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.	99
Figure IV-5 : Evolution temporelle du nombre de cellules de diatomées durant les 14 jours d'expérience.	101
Figure IV-6 : Evolution de la concentration en TEP et de la concentration en chlorophylle a durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes non enrichis (en haut) et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (en bas).	102
Figure IV-7 : Concentration volumique en TEP en fonction du rapport N/P dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et enrichis en sels nutritifs (à droite).	103
Figure IV-8 : Découplage des dynamiques du carbone et de l'azote durant la floraison, dans les mésocosmes (NT1 à NT4).	104
Figure IV-9 : Evolution du rapport molaire du carbone organique particulaire (COP) versus l'azote organique particulaire (NOP) dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.	104
Figure IV-10 : Evolution de la concentration en carbone lié aux TEP et de la production primaire durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.	105
Figure IV-11 : Production journalière de TEP normalisée par la biomasse phytoplanctonique dans les mésocosmes non enrichis (en haut) et dans les mésocosmes non enrichis (en bas).	107
Figure IV-12 : Facteur d'enrichissement des TEP, de la chlorophylle a totale et de la fraction supérieure à 10 µm après remise en suspension de l'eau des mésocosmes.	107
Figure IV-13 : Exemples de spectres de taille des TEP, dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT0, NT2, NT4) au quatorzième jour de l'expérimentation. Les droites de régression $dN/d[dp]=kdp^{\delta}$ ont été réalisées sans considérer les deux premières classes de taille.	108
Figure IV-14 : Variations temporelles des pentes (valeurs absolues) des spectres de taille des TEP dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs (T ; gauche) et enrichis en sels nutritifs (NT ; droite).	108
Figure IV-15 : Contribution des différentes classes de taille des TEP, en termes de volume, dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (à droite).	109
Figure IV-16 : Evolution de l'abondance et de la concentration volumique en TEP au cours des 14 jours d'expérience dans NT2 (gauche) et NT4 (droite).	110
Figure IV-17 : Concentrations volumiques des TEP dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, en fonction du leur diamètre de sphère équivalente sur la durée de l'expérience (jour 0 au jour 14).	111
Figure IV-18 : Evolution de la concentration en TEP et de la production bactérienne durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.	112
Figure IV-19 : Nombre de bactéries par TEP en fonction du diamètre de sphère équivalente des TEP.	113
Figure IV-20 : Résultats de l'ANCOVA : Effet de la turbulence sur la colonisation bactérienne des TEP, dans les mésocosmes non enrichis (haut) et enrichis en sels nutritifs (bas), le onzième jour d'expérimentation.	115
Figure IV-21 : Nombre de bactéries agrégées par surface de TEP en fonction de la taille des TEP.	115

Chapitre V

Figure V-1: Photographie d'un microscope électronique à transmission couplé à un micro-analyseur à rayons-X (haut). Schéma du principe de fonctionnement du MET-rayons X (bas).	132
Figure V-2: Micro-photographies de l'eau de mer échantillonnée dans les mésocosmes, visualisée au microscope électronique à transmission (MET). haut : eau de mer naturelle. bas : eau de mer enrichie en sels nutritifs, après 5 jours d'expérience.	136
Figure V-3 : Composition élémentaire des particules analysées au microscope électronique à transmission dans les mésocosmes non enrichis (haut) et enrichis en sels nutritifs (bas) durant les 7 jours d'expérience.	138

<i>Figure V-4 : Compositions élémentaires en C, N et P des particules organiques analysées au MET- rayons X dans T0 (gauche) et dans NT0 (droite).</i>	139
<i>Figure V-5 : Composition élémentaire en Ca, Mg, Mn et Fe, des particules organiques analysées au MET- rayons X issues de T0 (gauche) et de NT0 (droite).</i>	140
<i>Figure V-6 : Composition élémentaire (C versus N) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation.</i>	142
<i>Figure V-7 : Composition élémentaire (C versus P) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation.</i>	143
<i>Figure V-8 : Composition élémentaire (N versus P) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation.</i>	144
<i>Figure V-9 : Carbone organique particulaire (COP), carbone organique lié aux TEP déterminé avec le MET et calculé selon l'équation de Mari (1999) dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et enrichis en sels nutritifs (à droite), durant les 7 jours d'expérimentation.</i>	147

Conclusions

<i>Figure VI-1 : Schéma conceptuel du réseau trophique en milieu pélagique, intégrant les résultats obtenus durant ce travail de thèse (en rouge), et quelques perspectives envisagées (points d'interrogation).</i>	159
--	-----

Liste des Tableaux

Chapitre I

Tableau I-I : Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées en considérant les deux méthodes et 3 volumes (5, 10 et 20 ml).	22
Tableau I-II : Abondance totale des TEP aux 3 sites, selon les deux méthodes utilisées (FTF et LBD) et pour les 4 volumes filtrés.	22
Tableau I-III : Concentrations volumiques des TEP aux 3 sites, selon les deux méthodes utilisées et pour les 4 volumes filtrés.	27
Tableau I-IV: Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées en considérant les deux méthodes et 3 volumes (5, 10 et 20 ml).	27
Tableau I-V : Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées sur les 4 volumes en ne considérant que la méthode FTF.	27
Tableau I-VI : Classement des TEP en 4 sous-groupes selon leur taille et nomenclature attribuée. ..	30
Tableau I-VII : Récapitulatif des limites et des avantages des deux méthodes de mise en évidence des TEP.	37

Chapitre III

Tableau III-I : Concentrations en carbone organique particulaire (COP), en carbone organique dissous (COD), en carbone organique lié au phytoplancton (C-phyto) et en carbone organique des TEP (TEP-C), à DYFAMED et au Point B, de février 1999 à février 2000. La concentration en TEP-C a été comparée à celle en carbone organique total (TEP-C/COT).	77
---	----

Chapitre IV

Tableau IV-I : Récapitulatif des intensités de turbulence appliquées, équivalence en milieu naturel et nomenclature utilisée dans ce manuscrit.	93
Tableau IV-II : Corrélations (test du coefficient de corrélation r de Pearson) entre l'abondance bactérienne (Bact.), la production bactérienne (PB) et la concentration volumique des TEP, dans chacun des mésocosmes ($n = 8$).	111
Tableau IV-III : Pourcentages de TEP colonisées par des bactéries dans les mésocosmes.	112
Tableau IV-IV : Pourcentage de bactéries attachées aux TEP par rapport aux bactéries libres.	113
Tableau IV-V : Résultats de l'ANCOVA pour 2×3 échantillons indépendants.	114
Tableau IV-VI : Pourcentages de bactéries totales attachées aux TEP estimées lors d'études précédentes et dans cette étude.	125

Chapitre V

Tableau V-I : Concentrations en nitrates, phosphates et silicates dans les mésocosmes échantillonnés, lors des conditions initiales (jour 0) et après éventuel enrichissement en sels nutritifs (jour 1).	131
Tableau V-II : Nombre de particules analysées au cours de cette expérience.	134
Tableau V-III : Effet d'un apport en sels nutritifs sur le rapport C/N des particules analysées.	141
Tableau V-IV : Rapports molaires C/N de la matière organique particulaire totale (MOP) déterminées après filtration sur GF/F et rapport molaire C/N des particules organiques analysées au MET-rayons X.	145
Tableau V-V: Estimations de la concentration en éléments liés aux TEP lors des conditions naturelles.	146

<i>Tableau V-VI : Valeurs du carbone organique particulaire (COP), du carbone lié aux TEP déterminé à partir des données du MET (TEP-CMET), et calculé selon l'équation prédictive (TEP-Ccalculé), dans l'eau de mer naturelle.</i>	<i>146</i>
<i>Tableau V-VII : Concentrations en manganèse et en fer dans l'eau de mer (fraction dissoute) en zone de surface, dans des régions proches du site étudié, reportées dans la littérature.</i>	<i>153</i>

*« Pourquoi nous haïr ? Nous sommes solidaires, emportés par la même
planète, équipage d'un même navire. »*

Antoine de St Exupéry, extrait de Terre des hommes

Introduction générale

La compréhension du cycle du carbone dans les océans constitue l'un des enjeux majeurs en océanographie. En effet, prédire la façon dont les flux et les stocks de carbone répondent aux changements globaux (ou aux pressions anthropiques) est l'une des principales motivations rassemblant la communauté des biogéochimistes. Le réseau trophique pélagique s'avère être un élément clef du cycle du carbone de par son rôle de régulateur (1) des échanges de CO_2 entre l'atmosphère et la zone de surface des océans, (2) des exportations de carbone organique vers les profondeurs et (3) du transfert de carbone organique vers les ressources renouvelables (i.e disponibles aux maillons trophiques supérieurs ; Legendre & Rivkin 2002).

Avant les années 1970, la chaîne alimentaire marine était considérée comme simple et linéaire, débutant par les cellules phytoplanctoniques, elles-même ingérées par les herbivores et s'achevant avec les poissons et autres prédateurs, via le zooplancton métazoaire (Ex. Ryther 1969). C'est ce que l'on nomme « la chaîne alimentaire basée sur le broutage » (« Grazing food chain »), selon laquelle l'essentiel de la production primaire persiste sous forme particulière (Figure 1).

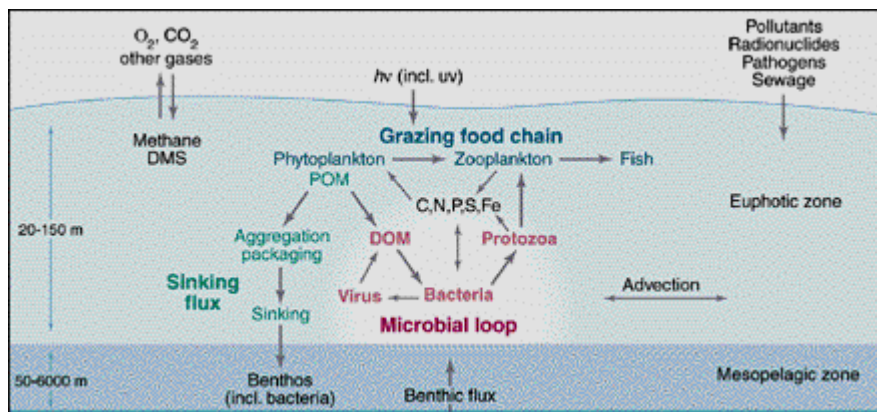


Figure 1 : Concept du réseau trophique en milieu pélagique, mettant en exergue l'importance de la boucle microbienne (« Microbial loop ») comme voie majeure pour les flux de matière organique. Schéma issu de Azam (1998).

Le concept de chaîne alimentaire s'est ensuite enrichi consécutivement à la mise en évidence du rôle des micro-organismes dans le cycle du carbone. En effet, une fraction du carbone fixé par le phytoplancton dans la zone euphotique des systèmes aquatiques est exsudée sous forme de matière organique dissoute (MOD) et recyclée via la boucle

microbienne par les bactéries, les virus et les protozoaires (Azam *et al.* 1994 ; Figure 1). En moyenne, la moitié de la production primaire océanique est transférée vers le compartiment microbien (Fuhrman & Azam 1982, Cole *et al.* 1988). Le concept de « boucle microbienne » a récemment été remplacé par celui de « réseau trophique microbien » incluant les flux de matière et d'énergie à nouveau dirigés vers les niveaux trophiques supérieurs (Rassoulzadegan 1993).

Au centre de ces nouvelles considérations, se situe la matière organique dissoute (MOD). La MOD, incluant les colloïdes (Koike *et al.* 1990, Wells & Goldberg 1991, Buffle *et al.* 1998), constitue le plus grand pool de carbone organique dans les océans (Farrington 1992). Connaître les mécanismes par lesquels ces substances organiques sont produites, dégradées ou converties sous forme particulaire est essentiel si l'on veut atteindre une compréhension prédictive des cycles biogéochimiques marins. Initialement, l'assimilation bactérienne était supposée être la voie majeure par laquelle la matière organique dissoute est transférée vers le compartiment particulaire. La formation abiotique des particules à partir de substances dissoutes a été découverte il y a 40 ans (Riley 1963), et bien que confirmée plus tard (Jensen & Søndergaard 1982, Johnson *et al.* 1986, Kepkay & Johnson 1988), elle n'a pas été assez prise en considération pour être incluse dans les modèles et les concepts du cycle du carbone. Mais l'étude des particules exopolymériques transparentes (TEP) a renforcé l'idée qu'il existe des voies abiotiques de transformation de matière organique dissoute en matière organique particulaire. En effet, les TEP sont formées par la coagulation de précurseurs dissous, en particulier de colloïdes et pourraient constituer ainsi une alternative à la minéralisation par les bactéries. (Alldredge *et al.* 1993, Zhou *et al.* 1998, Passow 2000 ; Figure 2).

De nombreux organismes incluant le phytoplancton et les bactéries génèrent de larges quantités de polysaccharides extracellulaires (Myklestad 1995, Aluwihare & Repeta 1999, Fajon *et al.* 1999, Stoderreger & Herndl 1999). Cette production extracellulaire représente une fraction considérable du carbone fixé lors de la photosynthèse. En effet, selon les études, elle peut représenter jusqu'à 58% de la production primaire (Myklestad *et al.* 1989, Baines & Pace 1991, Biddanda & Benner 1997, Nagata 2000). De telles substances exopolymériques, sont capables de s'agréger spontanément par coagulation pour former des particules organiques telles que les TEP (Figure 3).

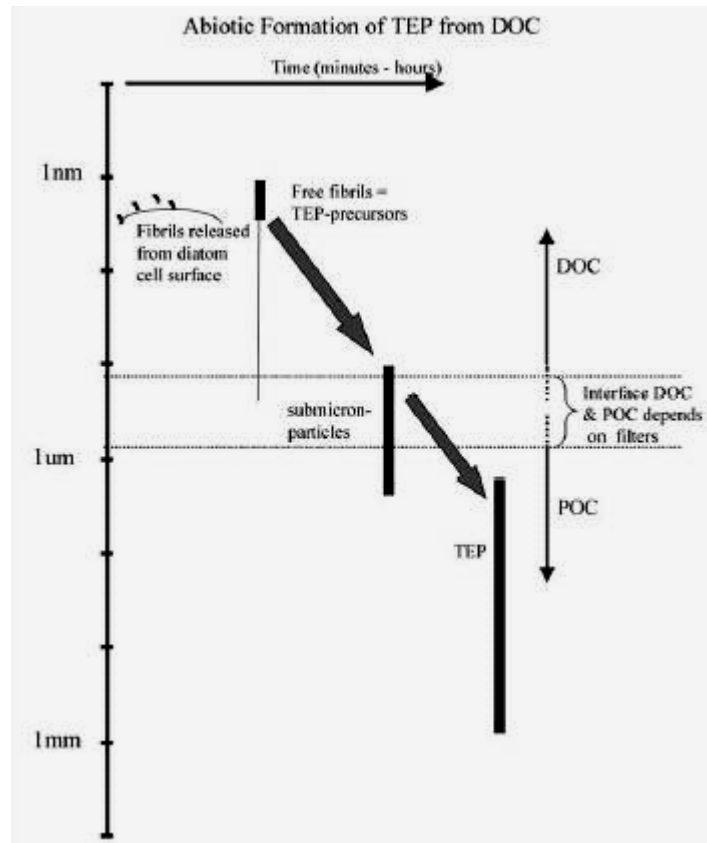


Figure 2 : Concept de la formation abiotique des particules exopolymériques transparentes (TEP) à partir de leurs précurseurs. Les TEP et leur précurseurs existent dans un continuum de taille, de la fraction particulaire à la fraction colloïdale. Schéma issu de Passow (2002b).

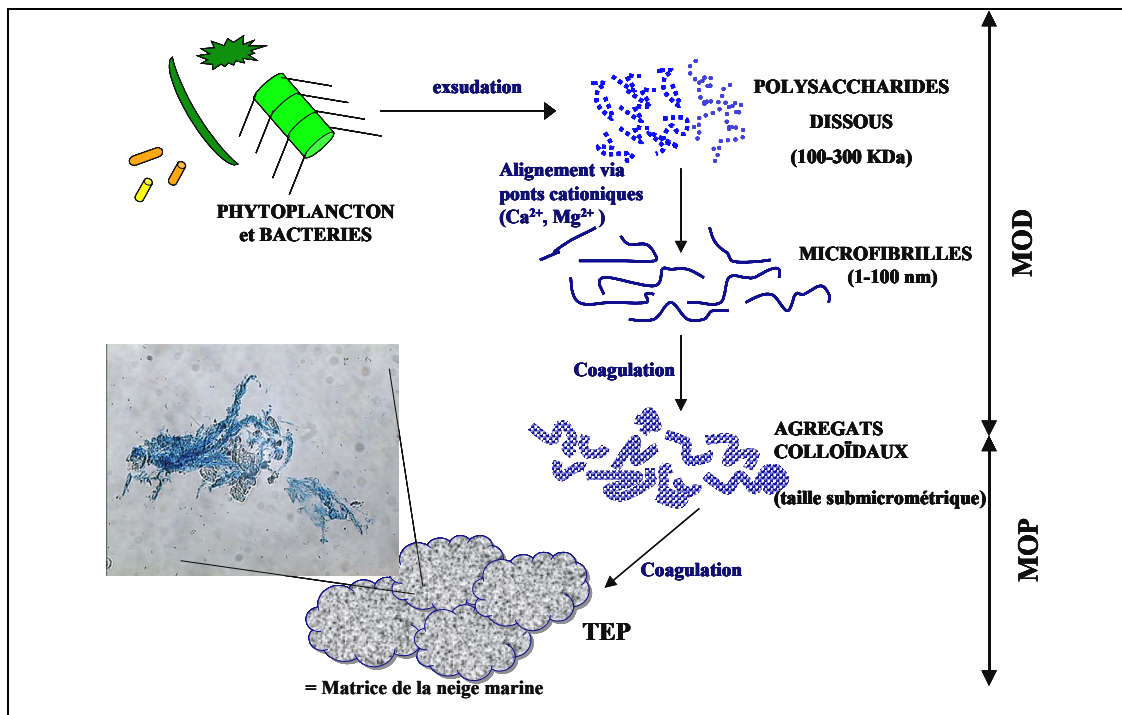


Figure 3 : Origine et mode de formation des particules exopolymériques transparentes.

Sachant que ces particules et leurs précurseurs semblent être assimilés par les bactéries (Norrman *et al.* 1995, Smith *et al.* 1995, Grossart *et al.* 1998), et sont également ingérés par des protozoaires filtreurs (Shimeta 1993, Tranvik *et al.* 1993) et par des copépodes (Ling & Alldredge 2003), alors la formation abiotique de ces particules et leur introduction dans la chaîne alimentaire représenteraient une dérivation à la boucle microbienne, rendant plus complexe encore notre vision du réseau trophique pélagique. Cette nouvelle voie de transfert du carbone est nommée « réseau basé sur l'agrégation » (« aggregation web », Passow 2002b, Figure 4). Elle inclut l'importation de carbone organique au réseau trophique via les TEP, ainsi que l'exportation de carbone organique par sédimentation de cellules phytoplanctoniques et de TEP sous forme d'agrégats (appelés également neige marine).

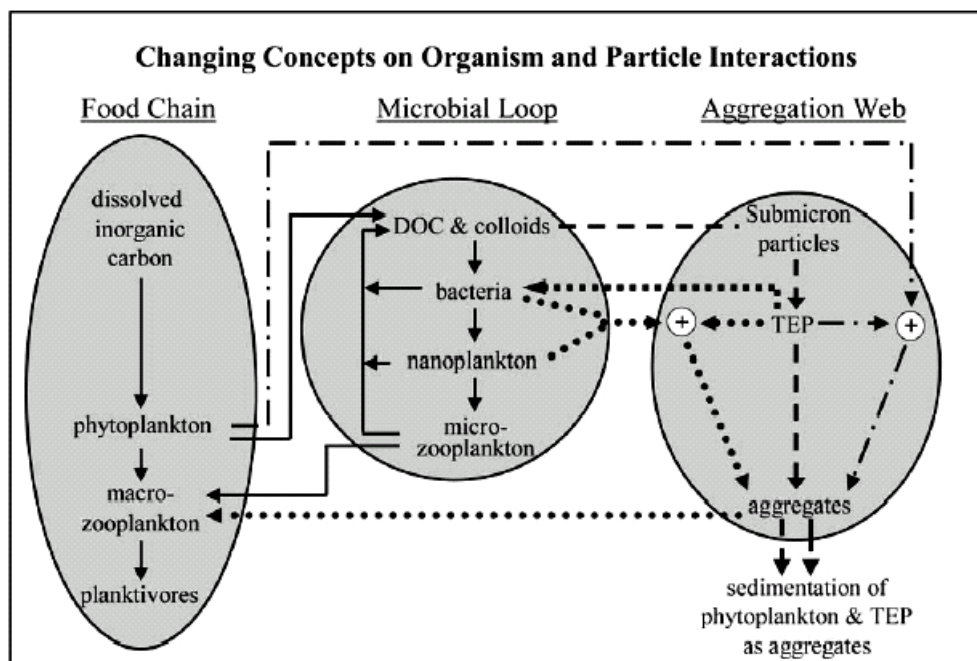


Figure 4 : Changements dans les concepts concernant les flux de carbone entre organismes et particules non vivantes, illustrant la chaîne alimentaire linéaire, la boucle microbienne et un nouveau réseau basé sur les processus d'agrégation. Schéma issu de Passow (2002b).

Cette nouvelle vision d'un réseau centré sur l'agrégation reste encore théorique. En effet, la contribution des colloïdes ainsi que celle des particules exopolymériques transparentes dans le réseau trophique pélagique, et par voie de conséquence dans le cycle du carbone océanique, sont encore peu documentées. L'objectif principal de ce travail de thèse est donc d'affiner nos connaissances concernant les mécanismes gouvernant la formation, la

dynamique et le devenir de ce pool de matière organique particulaire afin de mieux connaître sa contribution au cycle du carbone dans les océans.

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres suivis d'une conclusion générale intégrant quelques perspectives.

Nous proposons dans un premier temps de comparer deux techniques de détermination des particules exopolymériques transparentes en trois milieux de régime trophique différent. Cette approche méthodologique nous permettra d'établir un protocole précis et efficace que nous utiliserons par la suite.

Si l'on veut comprendre la dynamique des TEP (source, formation et devenir) ainsi que leurs implications dans les flux de matière, il s'avère indispensable d'établir un suivi à long terme de leurs caractéristiques, en milieu naturel. Dans ce dessein, nous décrirons la dynamique saisonnière des TEP en Méditerranée Nord-Occidentale en fonction des conditions hydrologiques et trophiques. Cette étude nous permettra également d'estimer la contribution des TEP au pool de carbone organique dans la colonne d'eau et d'évaluer leur rôle dans la surconsommation de carbone inorganique dissous, observée en période oligotrophique dans cette zone de la Méditerranée Nord-Occidentale.

Après une étude globale en milieu naturel, nous affinerons nos recherches par le biais d'une approche expérimentale en milieu contrôlé. Nous tenterons ainsi de comprendre comment la turbulence associée à différentes conditions trophiques, structure la formation, la dynamique et le devenir des particules exopolymériques transparentes.

Enfin nous explorerons l'échelle atomique en analysant la composition élémentaire des TEP au moyen de la microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X. Nous évaluerons ainsi le rôle de ces particules dans le cycle biogéochimique des éléments majeurs tels que le carbone, le phosphore et l'azote, mais également dans celui des éléments-traces tels que le fer et le manganèse.

Chapitre I

Comparaison de deux méthodes de mise en évidence des Particules Exopolymériques Transparentes (TEP)

A. Introduction	9
B. Matériels & Méthodes	11
1. Échantillonnage.....	11
a) Sites de prélèvement.....	11
b) Méthode de prélèvement.....	14
2. Filtration et coloration	14
3. Préparation des lames	16
a) Méthode du Filter-Transfer-Freeze (FTF).....	16
b) Méthode dite « des lames blanches dépolies» (LBD)	16
4. Témoins.....	17
5. Observation des TEP, énumération et mesure de la taille.....	17
6. Distribution de taille des TEP	19
7. Analyses statistiques	20
C. Résultats	22
1. Abondance	22
a) En fonction du volume filtré	22
b) En fonction de la méthode utilisée	24
2. Concentration volumique.....	25
a) En fonction du volume filtré	25
b) En fonction de la méthode utilisée	28
3. Distributions de taille	28
4. Observation des lames et morphologie des TEP	32
D. Discussion	34
1. La coloration au bleu Alcian	34
2. Observation et comptage	34
3. Comparaison des deux méthodes utilisées lors de cette étude.....	35
4. Autres approches méthodologiques	38
5. Conclusion	39

A. INTRODUCTION

L'étude des « agrégats organiques » et de leur rôle dans l'écosystème océanique a débuté il y a 40 ans avec les travaux de Riley (1963). La nature biochimique de ce matériel était alors inconnue ; cependant Riley observait une étroite relation entre la présence des diatomées et celle de ces agrégats qui tendaient à accroître leur taille par adsorption ou coagulation. En 1970, Gordon décrivait la présence de particules organiques transparentes (de 5 à 10 μm), riches en hydrates de carbone, mises en évidence par coloration selon la technique de dosage à l'acide périodique. Wiebe et Pomeroy (1972) utilisèrent ensuite le bleu Alcian, un colorant des polysaccharides pour observer « des agrégats floculants ressemblant à du mucus ». Ces agrégats frais et nouvellement formés étaient observés en période de forte croissance phytoplanctonique. Nul doute que les auteurs cités précédemment décrivissent ce que l'on nomme actuellement les Particules Exopolymériques Transparentes (TEP). La nature labile et fragile de ces particules ainsi que leur transparence rendaient difficile leur caractérisation.

Ce n'est qu'en 1993 (Alldredge *et al.*) que cette classe de particules fut décrite et nommée pour la première fois. Ces auteurs combinèrent une méthode de coloration au bleu Alcian et une technique de transfert sur lame (« Filter-Transfert-Freeze » (FTF) ; Hewes & Holm-Hansen 1983). Le bleu Alcian est un colorant hydrophile cationique formant un complexe avec les groupements carboxylés et sulfatés des acides polysaccharidiques. Le complexe ainsi formé précipite en solution aqueuse. Auparavant, ce colorant était utilisé pour la localisation histochimique de biopolymères acides et sulfatés de tissus animaux (Scott & Dorling 1965) et algaux (Parker & Diboll 1966). Ramus (1977) démontra que le bleu Alcian pouvait être utilisé en milieu aqueux pour l'analyse quantitative des polysaccharides d'origine algale.

Cette méthode est aujourd'hui largement utilisée pour la caractérisation des TEP. Elle permet de transférer les particules depuis le filtre vers une lame, par gel rapide de la préparation. Cependant, l'efficacité de transfert peut être variable et difficilement estimable. Afin d'éviter les problèmes liés au transfert et donc à l'éventuelle perte de matériel, Logan *et al.* (1994) ont proposé une technique d'observation directe des TEP sur lames blanches

dépolies. Cette technique nécessitant moins de manipulations semble efficace ; cependant elle n'est pas couramment utilisée.

Les deux méthodes citées précédemment n'ont jamais été confrontées. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les limites et les avantages de celles-ci afin d'établir un protocole le plus efficace possible. Nous tenterons ainsi de répondre aux questions suivantes :

- Les deux méthodes offrent-elles des résultats comparables ?
- Est-ce que l'efficacité de l'une ou l'autre technique dépend des conditions trophiques du milieu ?
- Quels sont les avantages et les limites de chacune d'elles ?
- Quelle méthode choisir à l'avenir ?

B. MATERIELS & METHODES

1. Échantillonnage

a) Sites de prélèvement

Cette étude a été effectuée en trois sites de régimes trophiques différents : un site côtier de la mer Adriatique, un fjord Norvégien ouvert sur la Mer du Nord et un site océanique de la mer Ligure (station DYFAMED).

- *Le site côtier* : Il est localisé dans le bassin nord de la Mer Adriatique, dans le golfe de Trieste (Italie, 45°42'N, 13°42'E ; Figure I-1). Le golfe de Trieste est la zone la moins profonde de la Mer Adriatique (32 m de profondeur au maximum). Ce site est considéré comme un environnement semi-clos, sujet à des apports d'eau douce très variables en fonction des saisons et selon les années (Degobbis *et al.* 1995). L'apport principal de nutriments provient de la rivière Isonzo, située au nord-ouest.

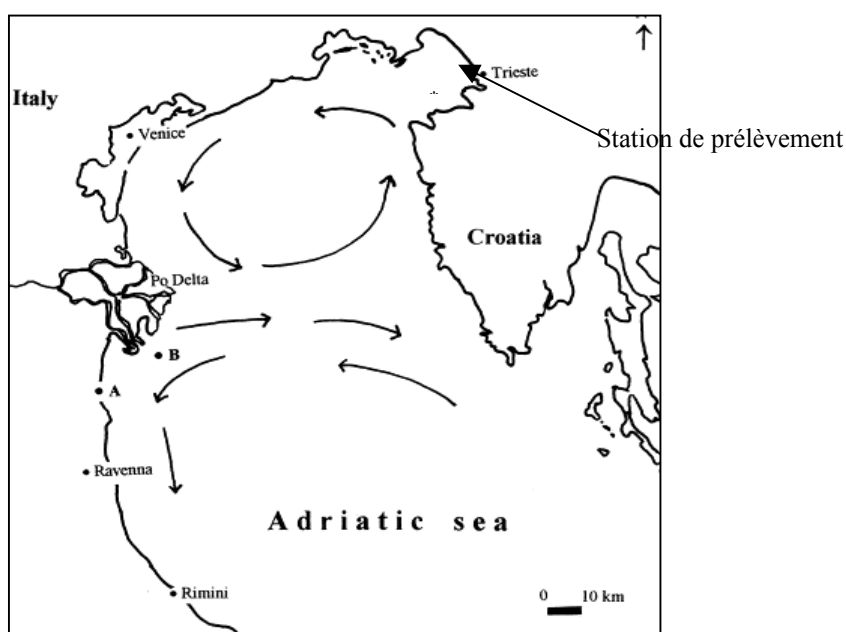


Figure I-1 : Site d'échantillonnage dans le bassin Adriatique nord. Carte issue de Thornton *et al.* (1999). Les flèches indiquent les circulations des courants prédominants en été.

Bien que l'ensemble de la Mer Adriatique soit considérée comme oligotrophique, le bassin nord peu profond est un site productif, potentiellement eutrophique (Figure I-2 ; Zavatarelli *et al.* 2000).

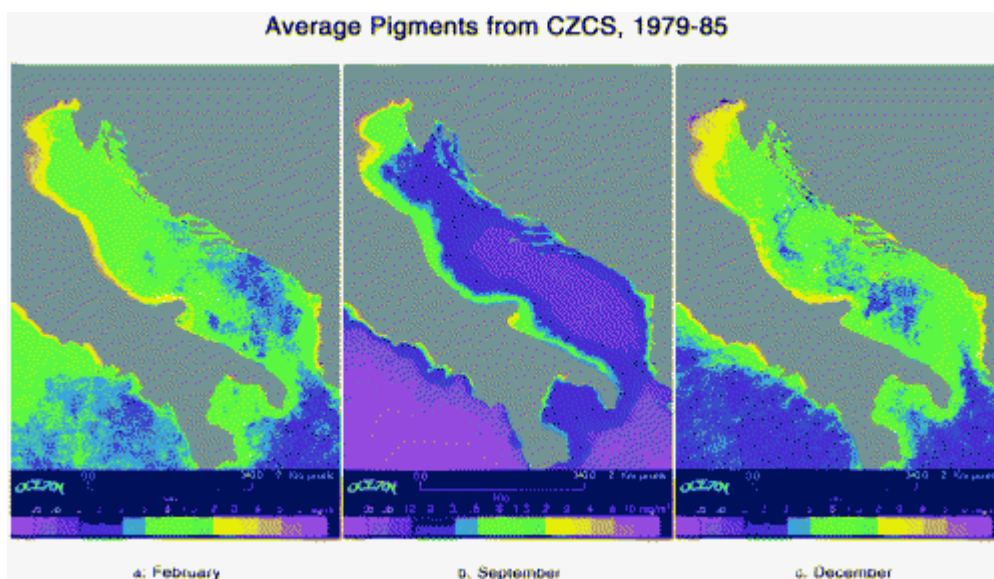


Figure I-2 : Distributions mensuelles moyennes des concentrations en chlorophylle *a* (mg m⁻³ ou µg l⁻¹), en surface en Mer Adriatique. Simulations à partir des données satellites « Coastal Zone Color Scanner » (CZCS ; issu de Zavatarelli *et al.* 2000).

Dans le Golfe de Trieste, la concentration annuelle en chlorophylle *a* varie de 1,00 à 1,72 µg l⁻¹. L'échantillonnage eut lieu en surface, en octobre 1999. Ce mois est caractérisé par le développement d'une floraison phytoplanctonique dominée par des diatomées, avec des concentrations en chlorophylle *a* variant de 1,2 à 2,9 µg l⁻¹ selon les années (Mozetic *et al.* 2002). Les concentrations en nitrates varient de 2 à 3 µM, celles de phosphates varient de 0,10 à 0,15 µM et celles de silicates sont inférieures à 2 µM. Globalement le bassin nord Adriatique est caractérisé par une limitation en phosphore (Zavatarelli *et al.* 1998, Mozetic *et al.* 2002).

- *Le fjord* : Il est localisé en Mer du Nord sur la côte norvégienne au sud de Bergen (Raunefjord ; 60°16'N, 5°14'E ; Figure I-3). Les prélèvements ont été effectués en juillet 2001, période post-floraison, relativement pauvre en nitrates. Les concentrations en sels nutritifs étaient alors de 0,57 µM de nitrates, 0,23 µM de phosphates (rapport N/P des sels nutritifs de 2,5) et 1,47 µM de silicates. La concentration en chlorophylle *a* atteignait 1,43 µg l⁻¹. Ce site est généralement eutrophique mais l'échantillonnage eut lieu en période de limitation en azote pour le phytoplancton.

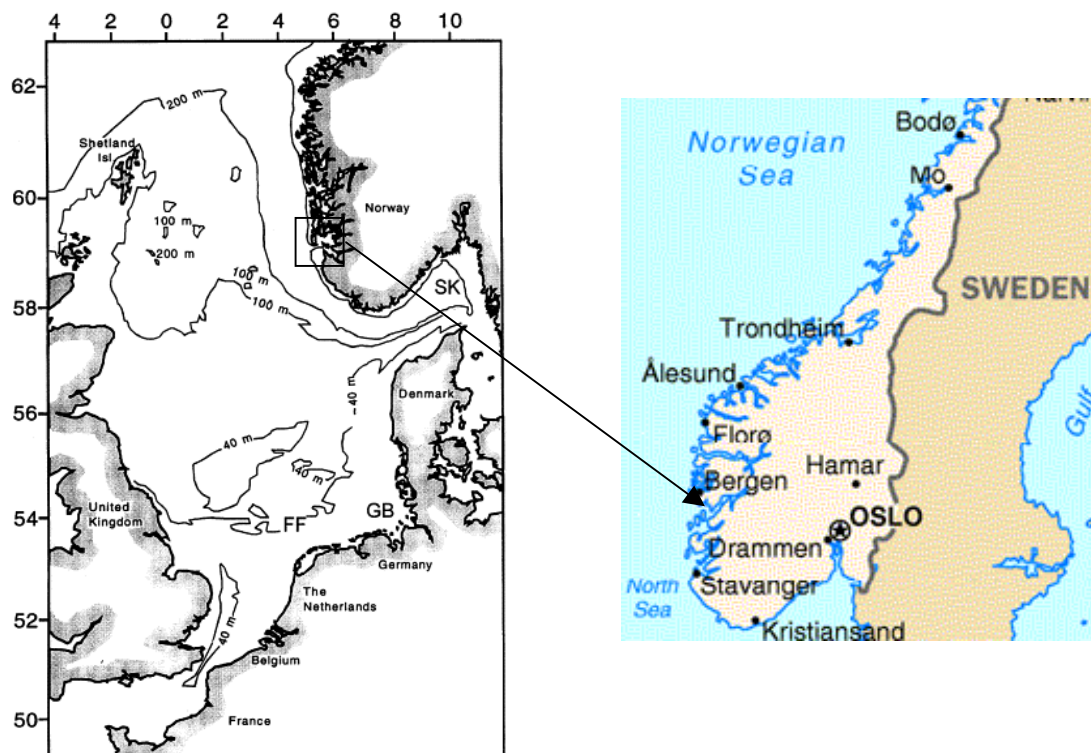


Figure I-3 : Site d'échantillonnage dans Raunefjorden, en Mer du Nord. Carte réarrangée d'après Van der Zee *et al.* (2003).

- *Le site océanique* (Figure I-4, station DYFAMED 43°25,2'N, 07°51,8'E) : Cette zone est caractérisée par des courants advectifs verticaux prépondérants, sans influence marquée des eaux continentales. Elle est donc considérée comme un site océanique (Béthoux *et al.* 1988, Marty *et al.* 1994, Andersen & Prieur 2000).

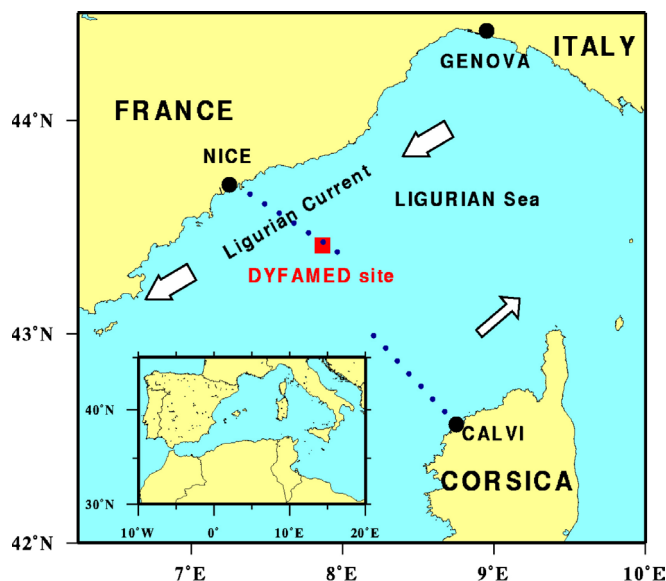


Figure I-4 : Zone d'étude en Méditerranée Nord-Occidentale. L'échantillonnage a été effectué au Site DYFAMED (site considéré comme océanique). Carte issue de Marty *et al.* (2002).

L'échantillonnage eut lieu en septembre 2002. La colonne d'eau était alors caractérisée par une forte thermocline à 22 m de profondeur limitant les échanges entre la zone de surface et la zone profonde (base de données JGOFS-DYFAMED <http://www.obs-vlfr.fr/jgofs2/sodyf/home.htm>). Nous ne possédons pas encore les données de sels nutritifs ; cependant en cette période, la colonne d'eau est considérée comme ultra-oligotrophique, caractérisée par des rapports N/P de sels nutritifs supérieurs à 20 (Marty *et al.* 2002) et des concentrations en chlorophylle *a* de l'ordre de $0,07 \mu\text{g l}^{-1}$ (moyenne en surface sur les années 1998, 1999 et 2000). Dans notre étude, ce site sera donc représentatif des milieux océaniques limités en phosphore et très pauvres en phytoplancton.

b) Méthode de prélèvement

Sachant que les TEP sont particulièrement abondantes dans la couche euphotique (Alldredge *et al.* 1993, Mari & Kjørboe 1996), les prélèvements ont été effectués dans la zone de surface (- 5 m) à chacun des sites. À la station DYFAMED, l'échantillonnage a été réalisé au moyen d'une bouteille Niskin (General Oceanics Inc.TM). Aux deux autres sites, les prélèvements ont été effectués au moyen d'un tuyau-pompe. Les échantillons d'eau ont été systématiquement conservés dans des bouteilles NalgèneTM afin de limiter d'une part, les risques de contamination de l'échantillon et d'autre part, l'effet d'adsorption de matière organique dissoute (MOD) sur les parois. Dans la mesure du possible, les échantillons ont été étudiés à l'état frais, dans l'heure suivant le prélèvement. Pour des raisons logistiques, les échantillons du site océanique ont été congelés et étudiés ultérieurement. La congélation de l'échantillon ne modifie pas les résultats (Passow & Alldredge 1995b).

2. Filtration et coloration

Cette étape est commune aux deux méthodes.

Le protocole est schématisé dans la partie supérieure de la Figure I-5. Une série d'échantillons d'eau de mer de volumes croissants (3, 5, 10 et 20 ml) est filtrée à travers un filtre polycarbonate de porosité de $0,2 \mu\text{m}$. Afin d'assurer l'adhésion de ce filtre, un sous-filtre de nitrocellulose de $0,45 \mu\text{m}$ de porosité est utilisé. La pression de filtration est maintenue basse et constante ($< 100 \text{ mbar}$). Une fois la filtration terminée, $500 \mu\text{l}$ d'une solution aqueuse de 0,06% d'acide acétique ($\text{pH} = 2,5$) et 0,02% de bleu Alcian 8GXTM (Hopkin & William, Chadwell Health, England) sont versés dans la colonne de filtration.

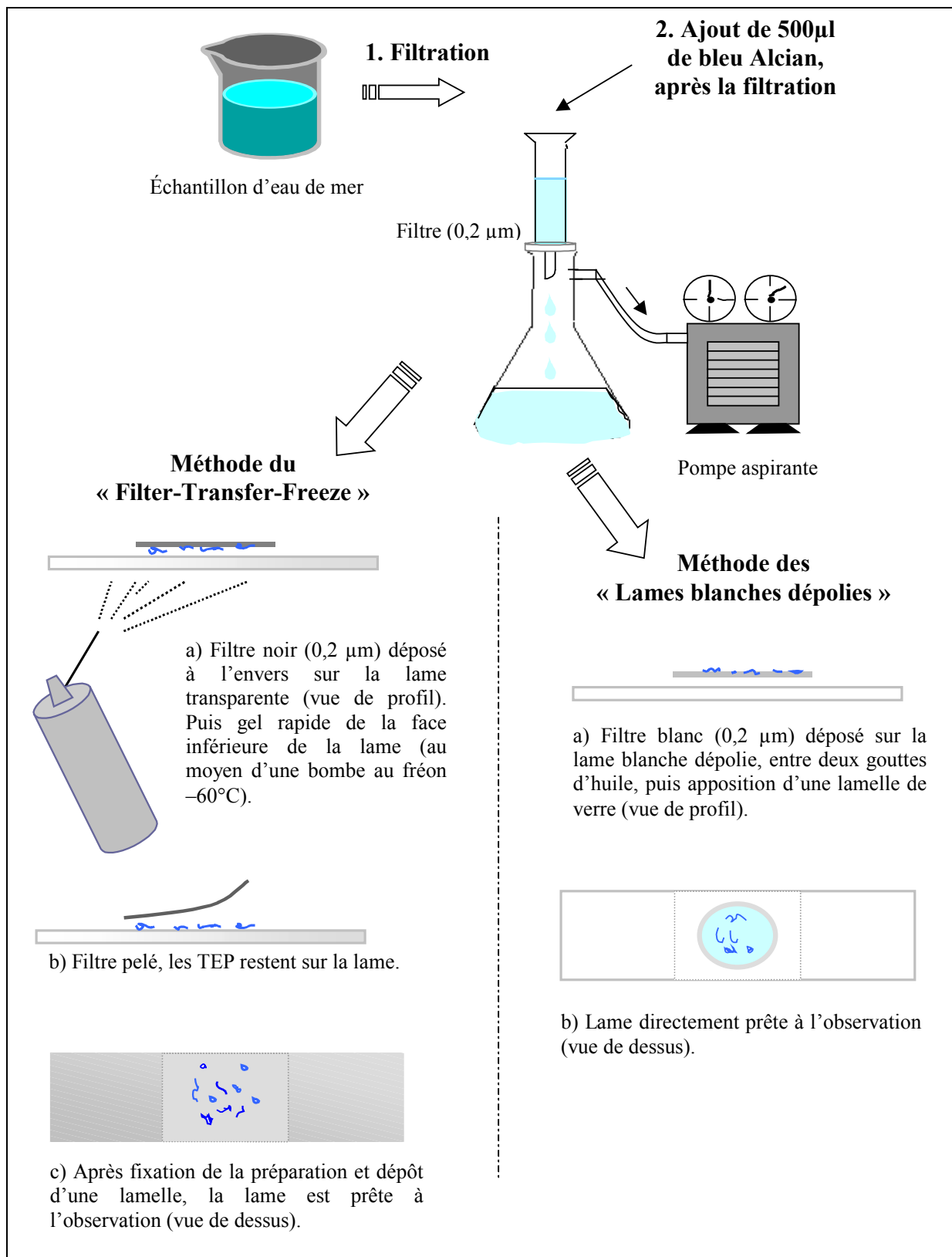


Figure I-5 : Matériel et méthodes utilisés pour la filtration, la coloration des TEP et la préparation des lames en vue d'une observation au microscope.

Le bleu Alcian est un colorant spécifique des polysaccharides chargés négativement (Parker & Diboll 1966) dont la sélectivité est contrôlée en faisant varier le pH ou la salinité de la solution (Horobin 1988). Seuls les polysaccharides carboxylés et sulfatés sont marqués ; les sucres neutres ne le sont pas. Ainsi, les TEP retenues sur le filtre, constituées majoritairement de sucres, sont colorées en bleu. Le bleu Alcian peut précipiter en présence de sels, c'est pourquoi la colonne de filtration et la base sont rincées à l'eau distillée entre chaque filtration consécutive. Pour chaque volume filtré, une série de trois réplicats est effectuée. Au total 65 échantillons ont été analysés.

3. Préparation des lames

a) Méthode du Filter-Transfer-Freeze (FTF)

Après coloration, les TEP sont transférées sur des lames en verre, transparentes (Figure I-5 gauche). Le filtre humide sur lequel se trouvent les TEP est retourné sur la lame à l'aide d'une pince millipore. La face opposée de la lame est immédiatement gelée au moyen d'un givrant au fréon (-60°C-1371-KF™). Le filtre ainsi gelé est pelé. Celui-ci doit offrir une certaine résistance. Cent micro-litres d'une préparation de gélatine (1%) et de glycérol (20%) préalablement chauffée à 30-35°C, sont déposés sur les particules encore gelées. La lame doit rester en position horizontale durant 20 à 25 minutes afin que la gélatine se solidifie. Lorsque la lame se réchauffe, la gélatine se répartit uniformément. On dépose enfin 100 µl de glycérol (fixateur) dilué à 20% dans de l'eau de mer filtrée, le tout étant recouvert d'une lamelle. Selon Hewes & Holme-Hansen (1983), cette technique offre un taux de transfert du matériel particulaire de 92 % et la morphologie reste préservée. Cependant, ces auteurs étudiaient le nanoplankton, constituant un matériel moins fragile que les TEP. Nous avons donc estimé, à trois reprises, le nombre de particules présentes sur le filtre après le transfert.

b) Méthode dite « des lames blanches dépolies » (LBD)

Après coloration, le filtre (de couleur blanche) est déposé entre deux gouttes d'huile à immersion (Zeiss 518 N) sur une lame blanche dépolie (Cyto-clear slide™ ; Poretics, Corp.). Une lamelle est posée sur la préparation en vue de l'observation au microscope (Figure I-5 droite). L'utilisation de lames blanches dépolies a été développée afin d'éliminer les problèmes d'interférence lumineuse avec les pores des filtres polycarbonates (Logan *et al.* 1994). Cependant, comme les particules sont observées sous champ clair et lumineux,

certaines possèdent un contraste faible après coloration. C'est pourquoi nous avons remplacé les filtres noirs utilisés par Logan *et al.* (1994) par des filtres blancs. Ainsi, les TEP colorées au bleu Alcian possèdent un contraste satisfaisant pour être visualisées.

4. Témoins

Avant chaque série d'expériences, des témoins ont été préparés à partir d'échantillons de 5 et 10 ml d'eau de mer filtrée deux fois sur 0,22 μm afin de ne conserver que la matière organique dissoute et de retirer l'ensemble du matériel particulaire. Les résultats ont montré la présence de petites TEP inférieures à 2 μm colorées en bleue. Ces particules sont en effet capables de se déformer pour traverser les pores du filtre ou de se désagréger très rapidement (Passow & Alldredge 1995b). Cependant, leur concentration étant négligeable et ce pour les deux méthodes, les témoins ont été ignorés. D'autre part, le bleu Alcian a été testé régulièrement en utilisant de l'eau de mer artificielle créée à partir d'une préparation de sels de mer en poudre ("sea salts" SIGMATM), diluée à 38,2‰ dans de l'eau distillée. Cette manipulation a permis de vérifier la création éventuelle d'artefacts susceptibles de se former en présence de ce colorant.

5. Observation des TEP, énumération et mesure de la taille

Cette étape est commune aux deux méthodes, elle est schématisée à la Figure I-6.

Les TEP sont visualisées à l'aide d'un microscope Axiophot-ZeissTM connecté à un micro-ordinateur par l'intermédiaire d'une caméra CCD vidéo couleur (COHU 2252-1040, résolution de 752x582 pixels, sensibilité minimale : 0,08 lux). Un logiciel de traitement d'images (Image Pro+ version 4TM) permet de visualiser les particules et de les compter de façon semi-automatique. Un filtre « High Gauss » est appliqué sur chaque image afin d'affiner leur qualité. Ce type de filtre permet de réduire le bruit sans perte de la définition, il accentue les formes en augmentant l'intensité des contrastes entre les transitions de couleurs.

Un minimum de 200 TEP est étudié à trois grossissements successifs : x100, x200 et x400 (soit 600 TEP par lame en moyenne). En effet Mari & Burd (1998) ont montré que l'étude de ces particules nécessitait une observation à différents grossissements afin de couvrir la totalité du spectre de taille et de minimiser la variabilité entre les mesures. L'étude des lames à un grossissement unique (x200) ne permet pas de visualiser les plus petites

particules qui sont les plus nombreuses et entraîne une mauvaise estimation des plus grandes qui s'avèrent être plus rares.

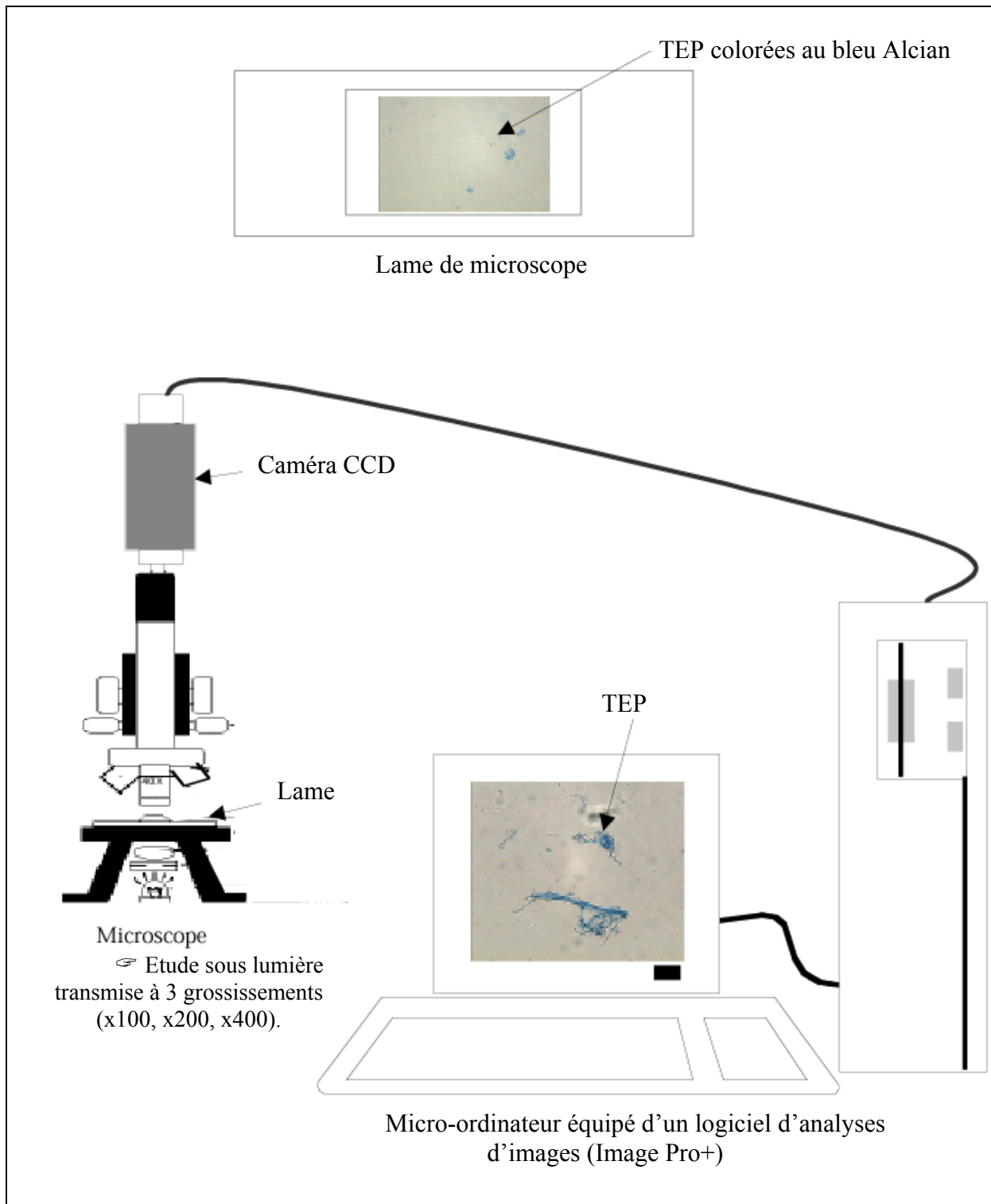


Figure I-6 : Matériels et méthodes utilisés pour l'observation, le dénombrement et la mesure des TEP ; Microscope couplé à une caméra couleur, elle-même reliée à un micro-ordinateur.

Chaque champ d'étude est choisi de façon aléatoire dans la zone où les particules sont réparties de façon homogène, en parcourant des transects parallèles. Connaissant la surface S en μm^2 de chaque particule, on en déduit leur diamètre de sphère équivalente (D_{se}) selon l'équation :

$$D_{se} = 2 \times \sqrt{(S / \pi)} \quad (1)$$

Les particules sont ensuite classées selon leur diamètre en 14 classes de taille logarithmique de $0,9 \mu\text{m}$ à $113 \mu\text{m}$. L'abondance totale (nb ml^{-1}) est calculée en fonction du nombre de champs observés pour une lame, du grossissement utilisé et du volume filtré.

La concentration volumique est calculée pour chaque classe de taille. Elle est exprimée en partie par million de volume d'eau (ppm). Sachant qu'une sphère de rayon R a comme volume :

$$V = (4 / 3) \pi R^3 \quad (2)$$

et connaissant le diamètre sphérique équivalent (D_{se}) des particules dans chaque classe de taille, alors V_i , le volume (μm^3) d'une particule dans la classe de taille i est :

$$V_i = (\pi \times D_{se}^3) / 6 \quad (3)$$

Connaissant, le nombre de TEP par ml (n_i) dans la classe de taille i , alors la concentration volumique (C_v) en ppm dans chaque classe de taille est :

$$C_v = V_i \times n_i \times 10^{-6} \quad (4)$$

6. Distribution de taille des TEP

La distribution de taille des TEP obéit à une relation de puissance classique, couramment utilisée pour caractériser la distribution des particules dans les océans (Sheldon *et al.* 1972). Elle est décrite par l'équation (5) établie par Mc Cave (1984).

$$dN/d(d_p) = k d_p^{\hat{o}} \quad (5)$$

où dN est le nombre de particules par unité de volume ayant un diamètre compris entre d_p et $[d_p + d(d_p)]$. d_p est le diamètre de sphère équivalente. La constante k dépend de la concentration des particules et \hat{o} décrit la distribution de taille : plus la pente \hat{o} (en valeur absolue) est grande, plus la fraction des petites particules comparativement aux grandes, est élevée. k et \hat{o} sont déterminés à partir des droites de régression de $\log[dN/d(d_p)]$ versus $\log(d_p)$ (Figure I-7).

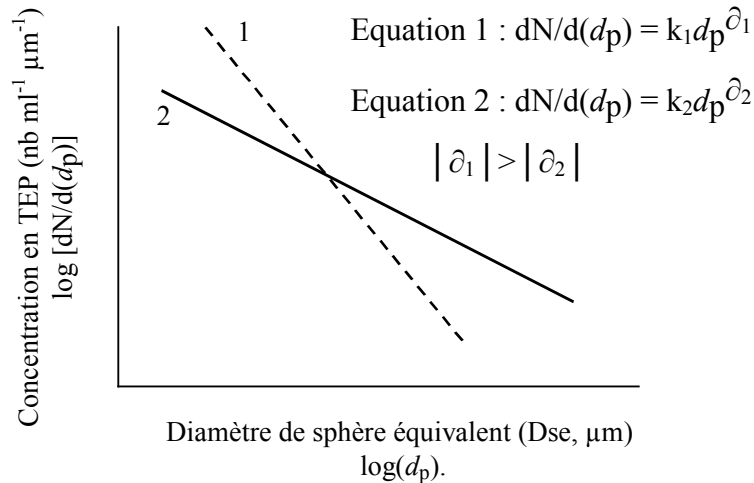


Figure I-7 : Distribution de taille théorique des TEP. δ = pente des droites de régression.

Afin de mieux appréhender l'importance relative des différentes classes de particules selon la méthode utilisée (FTF et LBD), et compte tenu du grand nombre de classes de taille, nous avons établi 4 sous-groupes. La mise en place de ces 4 sous-groupes a été réalisée au moyen d'une classification hiérarchique à lien simple, basée sur la matrice des distances euclidiennes. Les descripteurs sont les classes de taille établies auparavant. Les objets représentant les 65 échantillons étudiés ont été standardisés en divisant les valeurs de concentration par la largeur de la classe de taille, et ont fait l'objet d'une transformation logarithmique (Legendre & Legendre 1984). Les analyses ont été effectuées au moyen du logiciel Spad version 3.5

7. Analyses statistiques

Les valeurs d'abondance (nb ml⁻¹) et de concentration volumique (ppm) trouvées dans les échantillons sont soumises à l'action concomitante de plusieurs facteurs. Il s'agit de la méthode utilisée (facteur A) et du volume filtré (facteur B). Afin de mettre en évidence l'action isolée de chacun de ces facteurs et l'effet interactif de ces derniers, nous avons procédé en une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées. Les échantillons sont considérés comme appariés car chaque prélèvement d'eau (issus d'une même population) à fait l'objet de deux analyses (FTF et LBD), constituant les deux éléments de chaque paire. L'influence du facteur « site d'étude » ne pourra être analysée car nous disposons d'un seul prélèvement d'eau par site. Le logiciel SYSTAT 5.2™ a été utilisé pour ce traitement. Dans un premier temps, les données correspondant à un volume filtré de 3 ml ont été omises de cette analyse car elles présentaient des valeurs manquantes.

La variable dépendante (Y) sera la concentration volumique ou l'abondance des TEP. Afin de normaliser les données nous avons procédé à une transformation logarithmique des variables selon Taylor (1961) :

$$Y^* = Y^{(1-b/2)} \quad (6)$$

où Y^* est la variable transformée et b est la pente de la droite de Taylor (liaison moyenne-variance ; $b = 1,72$ pour les valeurs d'abondance et $b = 1,84$ pour les valeurs de concentration volumique).

Un test de Lilliefors (1967) sur les résidus de l'ANOVA après transformation confirme la normalité de la distribution ($p > 0,05$). L'hypothèse d'égalité des variances (homoscédasticité) est vérifiée par le test de Levene ($p > 0,05$). Les conditions d'application de l'analyse de variance sont donc respectées.

C. RESULTATS

1. Abondance

a) En fonction du volume filtré

Aux trois sites d'étude, le volume a un effet significatif sur les résultats d'abondance en TEP (Tableau I-I ; $p < 0,01$). Les abondances diminuent de façon significative lorsque l'on accroît le volume filtré, quelle que soit la méthode utilisée (Figure I-8). Au site océanique par exemple, la concentration moyenne varie de $5,4 \times 10^4$ TEP ml^{-1} lorsque 3 ml sont filtrés à $0,7 \times 10^4$ TEP ml^{-1} lorsque 20 ml sont filtrés avec la méthode du filter-transfer-freeze. De la même manière, la concentration varie de $5,3 \times 10^4$ à $1,1 \times 10^4$ TEP ml^{-1} lorsque la méthode des lames blanches est utilisée (Tableau I-II). Pour des volumes filtrés supérieurs à 5 ml les valeurs d'abondance deviennent davantage constantes. Ces résultats mettent en évidence l'importance du choix du volume filtré lorsque l'on étudie les particules exopolymériques transparentes.

Tableau I-I : Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées en considérant les deux méthodes et 3 volumes (5, 10 et 20 ml). La variable dépendante est l'abondance en TEP (nb ml^{-1}). (SCE = somme des carrés des écarts à la moyenne, ns = non significatif ; ** $p < 0,01$).

Sources de variation	ddl	SCE	Variances estimées	F	p
Volume	2	1,220	0,610	29,37	0,004**
erreur	4	0,083	0,021		
Méthode	1	0,063	0,063	2,94	0,23 ns
erreur	2	0,043	0,022		
Vol. x Méth.	2	0,048	0,024	2,70	0,18 ns
erreur	4	0,036	0,009		

Tableau I-II : Abondance totale des TEP (nb $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) aux 3 sites, selon les deux méthodes utilisées (FTF et LBD) et pour les 4 volumes filtrés. (\pm écart-type).

Volume	Site Côtier (C)		Site « Fjord » (F)		Site Océanique (O)	
	FTF	LBD	FTF	LBD	FTF	LBD
3 ml	$12,3 \pm 2,1$	—	2,8	$3,8 \pm 0,8$	$5,4 \pm 2,3$	$5,3 \pm 0,4$
5 ml	$5,8 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,9$
10 ml	$3,4 \pm 1,7$	$3,1 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,1$
20 ml	$1,5 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$

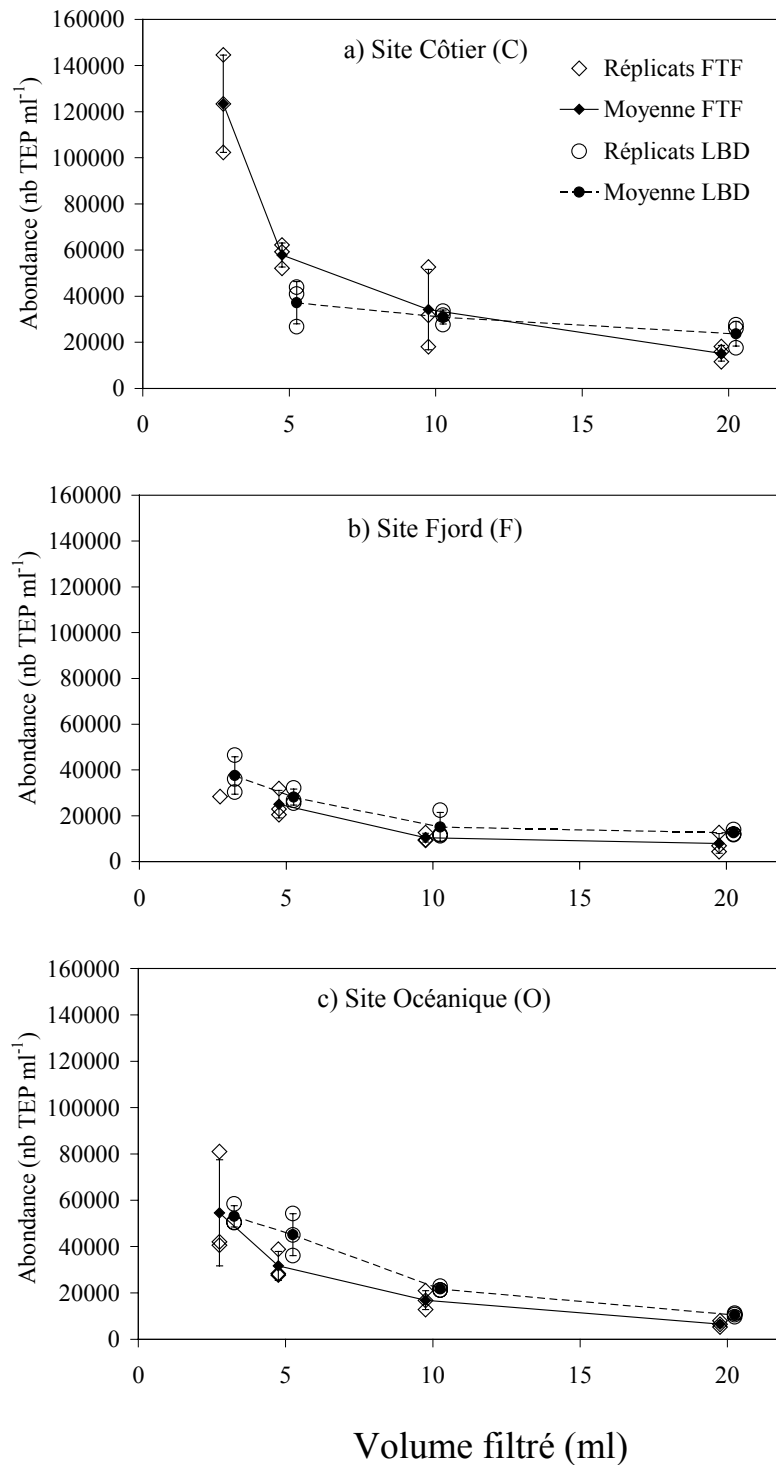


Figure I-8 : Abondance en TEP (nb ml⁻¹) en fonction du volume filtré (ml) selon la méthode « FTF » (losange) et selon la méthode « LBD » (rond) au site côtier (a) dans le fjord (b) et au site océanique (c). Les moyennes des 3 réplicats sont illustrées par des symboles pleins.

b) En fonction de la méthode utilisée

La Figure I-9 oppose les valeurs d'abondance totale des TEP selon les deux méthodes. La droite discontinue désigne la droite théorique de pente 1 qui existerait si les deux méthodes offraient des valeurs identiques pour un même échantillon. La régression de y en x a pour équation : $y = 0,67x + 1,1 \times 10^4$ ($R^2 = 0,75$, $n = 11$). Globalement, la méthode LBD révèle des abondances supérieures de 33% par rapport à la méthode FTF. Cependant ces différences ne sont pas significatives (Tableau I-I, $p > 0,05$). La dispersion des réplicats apparaît cependant plus importante avec la méthode du filter-transfer-freeze. De plus, la variabilité des résultats en fonction du volume filtré semble plus grande avec la méthode FTF. Au site côtier par exemple, on observe de très fortes valeurs d'abondances lorsque 3 ml sont filtrés ($12,3 \times 10^4$ TEP ml^{-1}), tandis qu'elles diminuent fortement lorsque l'on augmente le volume échantillonné. Il semble donc que la méthode LBD offre une meilleure reproductibilité.

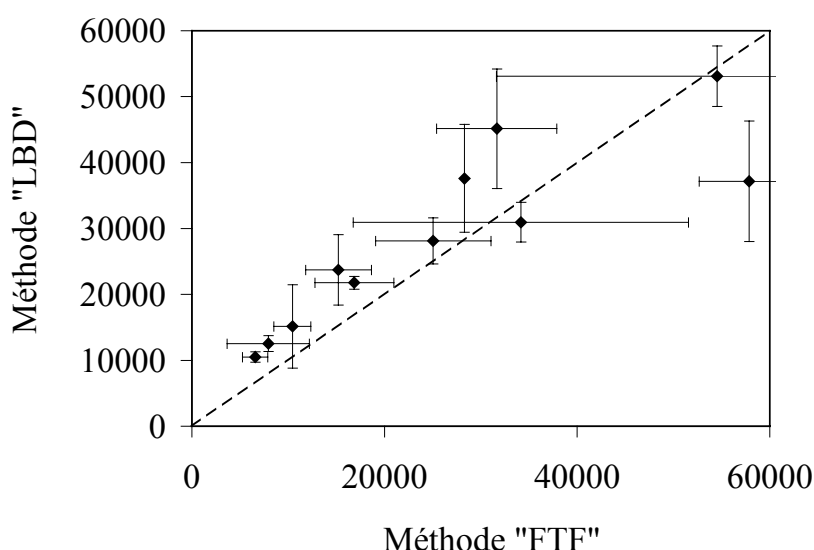


Figure I-9 : Abondances en TEP (nb ml^{-1}) selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ». Chaque point représente un même échantillon, étudié selon les 2 méthodes ; les barres verticales et horizontales sont les écart-types. La droite discontinue illustre la droite théorique de pente 1.

Concernant la méthode du FTF, nous avons estimé l'efficacité de transfert des TEP depuis le filtre vers la lame. Une efficacité de transfert de 100% signifie que l'on n'observe aucune TEP sur le filtre, toutes les particules sont donc déposées sur la lame. Dans le premier échantillon (10 ml filtré), l'efficacité de transfert est inférieure à 50% pour les particules de taille supérieure à 7 μm (Figure I-10). Dans le deuxième échantillon (volume filtré = 5 ml), l'efficacité de transfert est inférieure à 50% pour des TEP de taille variant de 5 à 28 μm .

Enfin, pour le dernier échantillon, l'efficacité de transfert est inférieure à 50% pour des TEP de 14 à 20 μm . Avec la méthode du FTF, il y a donc perte de matériel lors du transfert des TEP depuis le filtre vers la lame. Si l'on considère l'abondance totale, l'efficacité de transfert est respectivement de 68%, 70% et 86% pour le 1^{er}, le 2^{ième} et le 3^{ième} échantillon. L'efficacité de transfert est donc variable et pourrait expliquer d'une part pourquoi les écart-types sont généralement supérieurs avec cette méthode, et d'autre part pourquoi les abondances observées sont globalement inférieures.

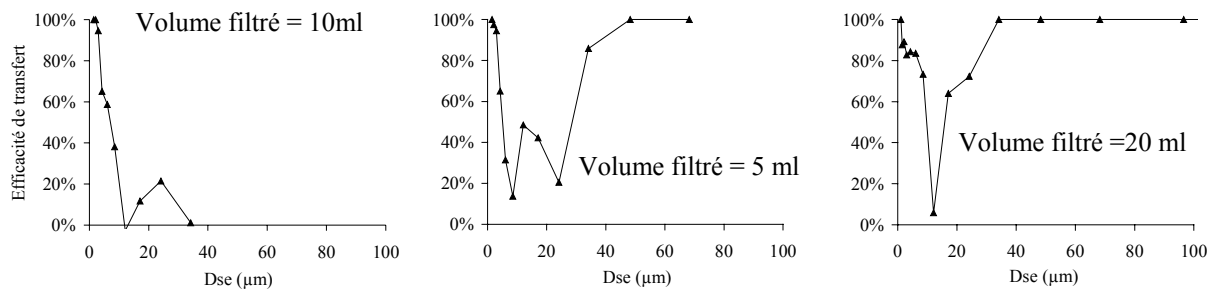


Figure I-10 : Efficacité de transfert des TEP, depuis le filtre vers la lame, en fonction de la taille des particules. Méthode FTF, échantillons de DYFAMED. (Dse = diamètre de sphère équivalente des TEP ; μm).

2. Concentration volumique

a) En fonction du volume filtré

Pour un même échantillon, la fraction volumique totale des TEP diminue avec le volume filtré (Figure I-11) Cependant avec la méthode LBD, les valeurs de concentrations volumiques sont globalement plus stables en fonction du volume filtré comparativement aux valeurs d'abondance. Au site côtier et dans le fjord, la concentration volumique est constante lorsque 10 ou 20 ml sont filtrés quelle que soit la méthode (Tableau I-III). Elle varie de 4,1 à 4,9 ppm (FTF) et est égale à 1,4 ppm (LBD) au site C. Elle varie de 12,3 à 12,4 ppm (FTF) et atteint 4,1 ppm (LBD) au site F. Au site océanique, il est plus difficile de déterminer une zone de palier.

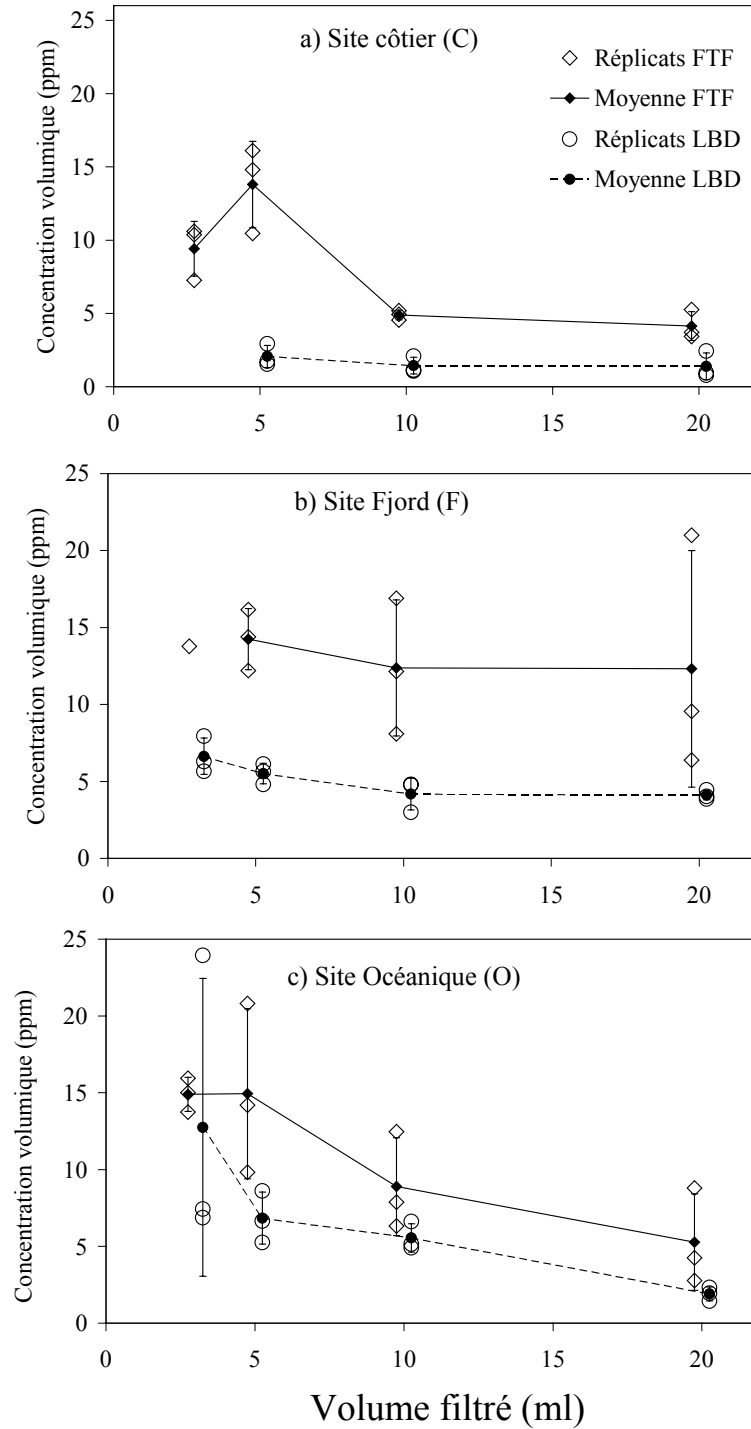


Figure I-11 : Concentration volumique des TEP (ppm) en fonction du volume filtré (ml) selon la méthode « FTF » (losange) et selon la méthode « LBD » (rond) au site côtier (a) dans le fjord (b) et au site océanique (c). Les moyennes des 3 répliques sont illustrées par des symboles pleins.

Tableau I-III : Concentrations volumiques (ppm ; \pm écart-types) des TEP aux 3 sites, selon les deux méthodes utilisées et pour les 4 volumes filtrés.

Volume	Site Côtier (C)		Site « Fjord » (F)		Site Océanique (O)	
	FTF	LBD	FTF	LBD	FTF	LBD
3 ml	9,4 \pm 1,9	—	13,78	6,6 \pm 1,2	14,9 \pm 1,1	12,7 \pm 9,7
5 ml	13,8 \pm 2,9	2,1 \pm 0,7	14,2 \pm 1,9	5,5 \pm 0,7	14,9 \pm 5,5	6,8 \pm 1,7
10 ml	4,9 \pm 0,3	1,4 \pm 0,6	12,4 \pm 1,4	4,2 \pm 1,0	8,9 \pm 3,2	5,5 \pm 0,9
20 ml	4,1 \pm 0,9	1,4 \pm 0,9	12,3 \pm 7,7	4,1 \pm 0,3	5,3 \pm 1,1	1,9 \pm 0,4

L'effet du volume filtré sur les résultats de fraction volumique n'apparaît pas significatif ($p > 0,05$; Tableau I-IV). Cependant il s'agit probablement d'une erreur de type I, car le degré de liberté est faible et nous avons omis de nos analyses les volumes correspondant à 3 ml. Afin d'affiner nos résultats nous avons effectué la même ANOVA en ne considérant que la méthode FTF qui ne présente pas de valeurs manquantes mais en intégrant les 4 volumes (3, 5, 10 et 20 ml). Dans ce cas, les résultats montrent un effet significatif du volume filtré sur la concentration volumique (Tableau I-V ; $p < 0,01$).

Tableau I-IV: Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées en considérant les deux méthodes et 3 volumes (5, 10 et 20 ml). La variable dépendante est la concentration volumique (ppm). (SCE = somme des carrés des écarts à la moyenne, ns = non significatif ; * $p < 0,05$).

Sources de variation	ddl	SCE	Variances estimées	F	p
Volume	2	0,01564	0,00782	6,02	0,062 ns
erreur	4	0,00520	0,00130		
Méthode	1	0,04361	0,04361	27,44	0,035*
erreur	2	0,00318	0,00159		
Vol. x Méth.	2	0,00075	0,00037	0,99	0,45 ns
erreur	4	0,00151	0,00038		

Tableau I-V : Résultats de l'analyse de variance à mesures répétées sur les 4 volumes (3, 5, 10 et 20 ml) en ne considérant que la méthode FTF. La variable dépendante est la concentration volumique (ppm). ($p < 0,01$).**

Sources de variation	ddl	SCE	Variances estimées	F	p
Volume	3	0,01335	0,00445	6,78	0,0023**
erreur	6	0,00394	0,00066		

b) En fonction de la méthode utilisée

L'analyse de variance à mesures répétées révèle une influence de la méthode utilisée (Tableau I-IV ; $p < 0,05$) sur les concentrations volumiques. La concentration volumique est systématiquement supérieure lorsque la méthode du Filter-Transfer-Freeze est utilisée comparativement à la méthode des lames blanches dépolies. L'interaction entre le facteur « méthode » et le facteur « volume » n'est pas significative ; pour une modalité de volume donnée, les différences entre méthodes sont identiques dans les populations. Les réplicats sont globalement moins dispersés avec la méthode des lames blanche dépolies (Figure I-12), confirmant à nouveau la meilleure reproductibilité qu'offre cette méthode.

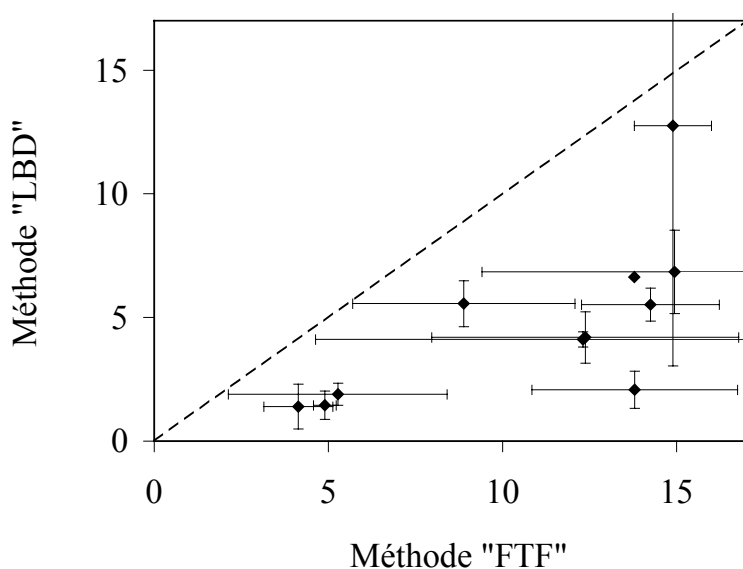


Figure I-12 : Fraction volumique des TEP (ppm) selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ». Chaque point représente un même échantillon, étudié selon les 2 méthodes ; les barres verticales et horizontales sont les écart-types. La droite discontinue illustre la droite théorique de pente 1.

3. Distributions de taille

La taille des TEP varie de 1 à un peu moins de 100 μm (exemples Figure I-13). Le nombre de TEP diminue lorsque la classe de taille augmente, ce qui est la loi générale des particules en système aquatique. L'ensemble des distributions est présenté en annexe A. Quelle que soit la méthode utilisée, la distribution de taille des TEP obéit à une loi de puissance dans la gamme de taille de 2 à 40 μm . En deçà, la distribution s'éloigne systématiquement de la droite théorique. En effet, les particules inférieures à 2 μm sont généralement sous-estimées. Les TEP de tailles supérieures à 34 μm le sont également.

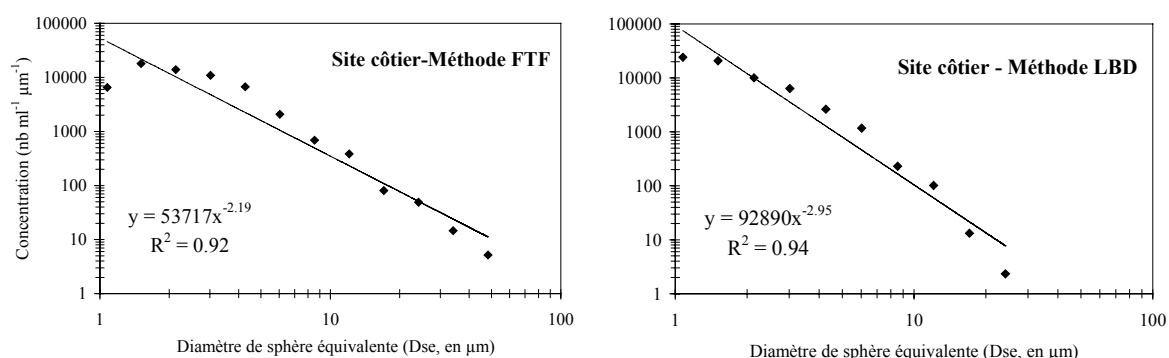


Figure I-13 : Exemples de spectre de taille des TEP : au site côtier en appliquant la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (à gauche) et en utilisant la méthode des lames blanches dépolies (à droite) dans un même échantillon.

La Figure I-14 oppose les deux méthodes en considérant les valeurs absolues des pentes des spectres de taille. Celles-ci sont systématiquement supérieures lorsque la méthode des lames blanches dépolies est utilisée. Ces résultats impliquent une alternative, à savoir la présence et/ou l'observation de davantage de petites TEP avec la méthode LBD ou inversement, la présence et/ou l'observation de davantage de grandes TEP avec la méthode du FTF.

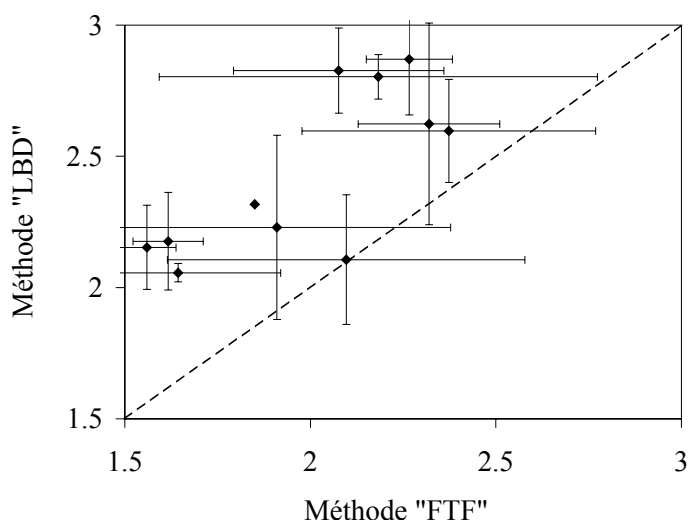


Figure I-14 : Pentes des spectres de taille selon la méthode des « Lames Blanches Dépolies » versus la méthode du « Filter-Transfer-Freeze ». Chaque point représente la moyenne d'un même échantillon, étudié selon les 2 méthodes ; les barres verticales et horizontales sont les écart-types. La droite discontinue illustre la droite théorique de pente 1.

Afin de pousser plus loin l'analyse, nous nous sommes attachés à décrire la part relative des différentes classes de taille établies selon les critères d'une classification hiérarchique (Figure I-15). Deux groupes majeurs se distinguent à la distance euclidienne de

7,5 environ correspondant aux TEP supérieures à 40 μm et à celles inférieures à 40 μm . À l'intérieur de ce deuxième groupe, trois sous-groupes se différencient (distance euclidienne d'environ 6) : le groupe des petites TEP (inférieures à 2 μm), celui des TEP de taille moyenne (de 2 à 28 μm) et celui des plus grandes (de 28 à 40 μm). Nous fonderons nos analyses sur ces 4 sous-groupes. Le Tableau I-VI récapitule ces résultats en indiquant la nomenclature utilisée par la suite.

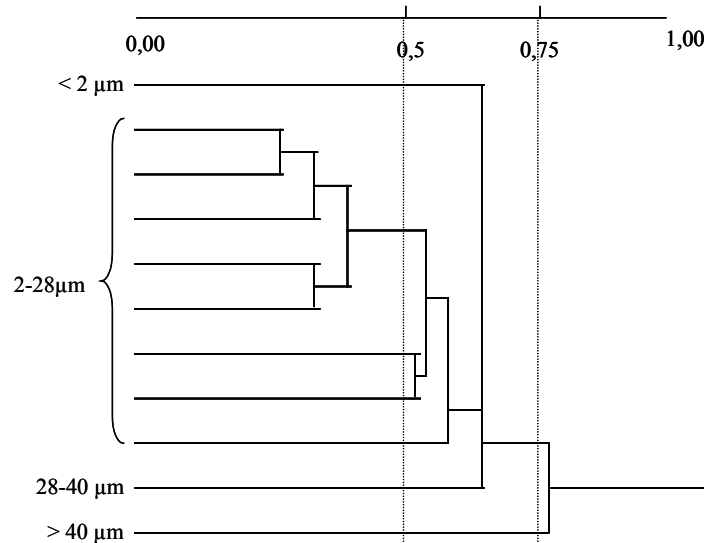


Figure I-15 : Classification hiérarchique basée sur la méthode du plus proche voisin. La distance métrique est la distance euclidienne.

Tableau I-VI : Classement des TEP en 4 sous-groupes selon leur taille (Dse) et nomenclature attribuée.

	Petites	Moyennes	Grandes	Très grandes
Nomenclature	P	M	G	TG
Taille	< 2 μm	2 à 28 μm	28 à 40 μm	> 40 μm

La contribution des différentes classes de taille varie selon le site étudié, mais le schéma général est le même quelle que soit la méthode utilisée (Figure I-16).

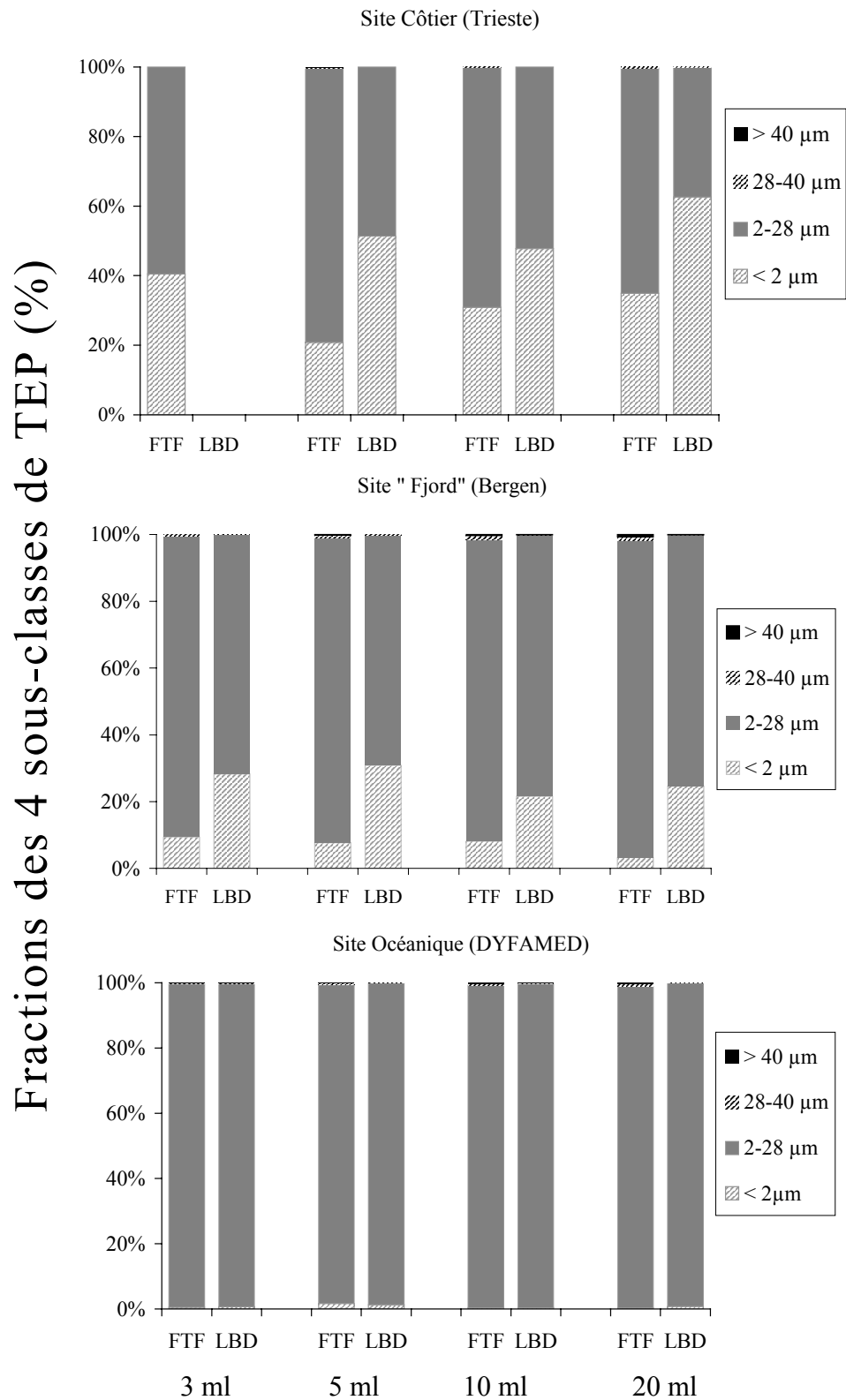


Figure I-16 : Contribution des 4 principales classes de taille des TEP (%) aux 3 sites en fonction du volume filtré (3, 5, 10 et 20 ml) et selon les deux méthodes (FTF et LBD).

En effet, au site côtier, les particules inférieures à 2 μm tiennent une part importante (20,9 à 62,6%), et ce avec les deux méthodes. À l'inverse, au site océanique, les petites particules sont quasi-inexistantes (0,3 à 1,7%) à nouveau, selon les deux méthodes. Il semble donc que les deux techniques révèlent correctement la part relative de chaque classe de taille. Néanmoins, pour un même échantillon, on observe systématiquement une contribution supérieure des TEP plus grandes avec la méthode FTF. Il semble que les petites particules soient mieux observées avec la méthode LBD. Les particules supérieures à 40 μm , ne sont observées qu'avec la méthode du FTF, elles ne représentent jamais plus de 0,1% de l'ensemble des TEP, lorsque la méthode des LBD est utilisée. Enfin, la fraction des grandes (28-40 μm) et des très grandes TEP (> 40 μm) augmente avec le volume de l'échantillon, en particulier avec la méthode du FTF. Ceci confirme une tendance à l'agrégation des particules lorsque le volume filtré augmente.

4. Observation des lames et morphologie des TEP

La morphologie des TEP est différente selon la méthode utilisée (Figure I-17). Avec le filter-transfer-freeze, les particules ont des formes très variées. Elles sont ovoïdes, filamenteuses ou sans forme précise. La texture fibrillaire semble être davantage préservée. De plus, cette méthode, dont l'observation se réalise sans filtre, offre un très bon contraste entre les particules colorées au bleu Alcian et le fond de la lame transparente. La visualisation des TEP est donc très bonne. Avec la méthode des lames blanches dépolies, la morphologie des particules est plus homogène : les TEP sont généralement rondes ou ovales. Elles sont d'une manière générale, plus petites. Ceci est confirmé avec les analyses décrites précédemment à la Figure I-14 et à la Figure I-16. Avec cette méthode, la texture fibrillaire est rarement observée. En effet, la visualisation offre un moins bon contraste comparativement à la méthode du FTF.

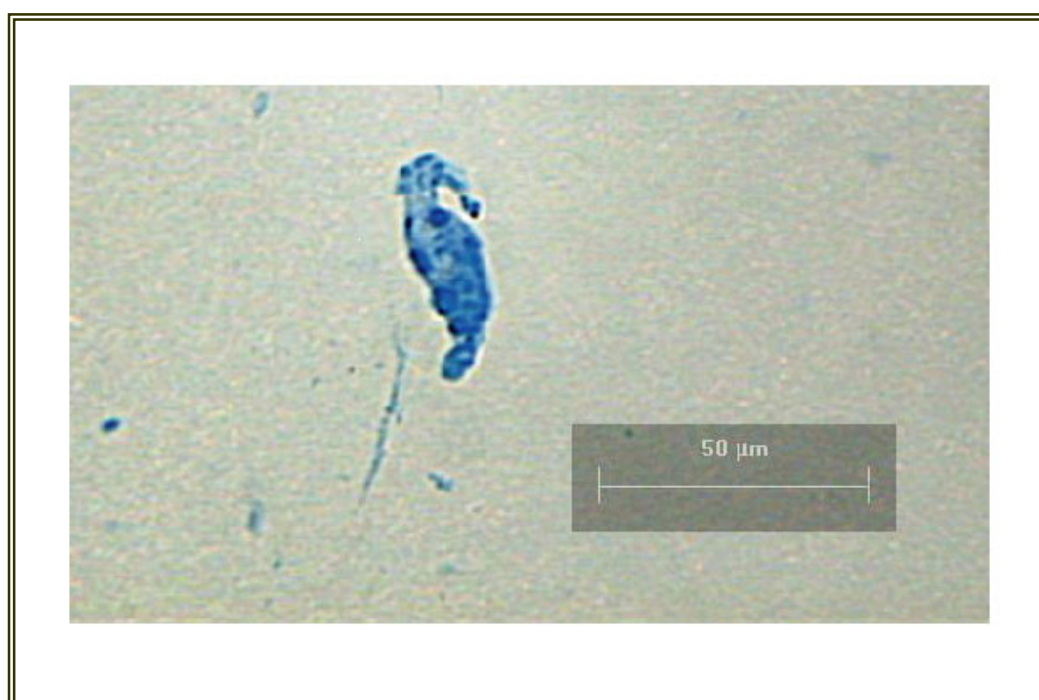
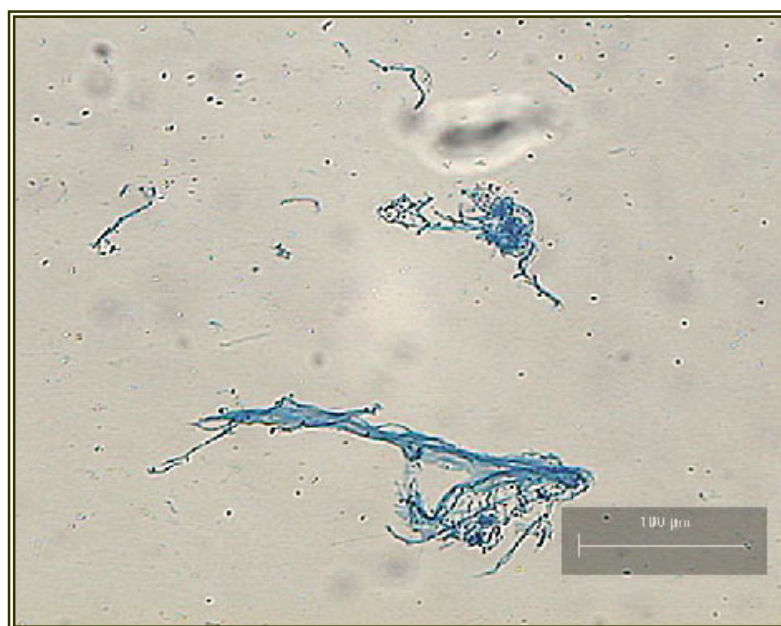


Figure I-17 : Photographies des TEP mises en évidence selon la méthode du FTF (haut) et selon la méthode des lames blanches dépolies (bas).

D. DISCUSSION

1. La coloration au bleu Alcian

Wiebe et Pomeroy (1972) furent les premiers à utiliser le bleu Alcian pour observer ce qu'ils nommaient « les agrégats organiques ». Mais l'obligation d'utiliser un colorant pour les visualiser au microscope a souvent été critiqué, critique portant sur la possibilité d'un artefact. Récemment, Chin *et al.* (1998) ont démontré que la matière organique dissoute (MOD) pouvait s'assembler spontanément pour former des microgels atteignant des tailles de l'ordre du micromètre. Ce pool de matière organique est constitué par les colloïdes, les agrégats et les TEP. Puisque la cinétique de formation de ces particules est suivie par des techniques de spectroscopie laser ne nécessitant aucun colorant, les critiques liées aux expériences antérieures n'ont à présent plus lieu d'être.

Cependant l'utilisation du bleu Alcian pourrait présenter certains inconvénients liés principalement à l'efficacité de la coloration. En effet, il s'agit d'un colorant cationique qui forme un complexe avec les groupes carboxyl ($-\text{COO}^-$) et sulfates ($-\text{OSO}_3^-$) des polysaccharides chargés négativement mais qui ne colore pas les sucres neutres. La capacité de coloration des TEP dépend donc de leur composition spécifique en sucres et en particulier de leur densité en anions (Ramus 1977). Toutefois, comme il est peu probable que les TEP ne soient constituées que de sucres neutres, la présence de ceux-ci devraient agir seulement sur l'intensité de la coloration et non pas sur l'efficacité de cette méthode pour visualiser les TEP (Mari 1997).

2. Observation et comptage

La qualité de l'analyse dépend aussi de l'observation et du comptage. À l'origine, les TEP étaient étudiées sous un seul grossissement (x200) (Alldredge *et al.* 1993), ce qui posait des problèmes statistiques. De plus, avec cette méthode, les plus petites TEP, qui sont les plus abondantes, n'étaient pas observées. De façon à améliorer la détermination de la distribution de taille de ces particules, nous avons utilisé la méthode d'étude sous microscope, perfectionnée par Mari et Burd (1998). Elle consiste en l'étude des TEP à trois grossissements successifs (x100, x200 et x400) et à maximiser le nombre des observations (600 TEP par filtre). Si l'on considère la forte corrélation entre la distribution de taille observée et la loi de

puissance théorique, il apparaît que cette méthode permet une description fidèle de leur distribution de taille.

3. Comparaison des deux méthodes utilisées lors de cette étude

Pour un échantillon donné, l'abondance et la concentration volumique diminuent lorsque le volume filtré augmente et ce, quelle que soit la méthode utilisée. En effet, si le volume est trop élevé, les particules ont tendance à s'agréger lors de la filtration entraînant une diminution de la concentration et une augmentation de la taille moyenne. Ceci est confirmé à la Figure I-16 où la contribution des plus grandes TEP augmente avec le volume. À l'inverse, quand le volume filtré est trop faible (inférieur à 5 ml), les particules dans l'échantillon ne sont pas assez nombreuses. Il y a perte de la distribution aléatoire sur le filtre. Les écarts-types sont variables avec les deux méthodes bien qu'ils puissent devenir faibles selon le volume filtré. Ceci met en exergue l'importance du volume à choisir lorsque l'on étudie l'abondance en TEP d'un échantillon. Chaque nouvelle analyse d'un échantillon d'eau de mer dont la concentration en TEP est inconnue, doit débiter par l'établissement d'une courbe de calibration. Lors de ce travail de thèse, pour chaque échantillonnage, nous avons compilé les résultats correspondants à trois volumes différents (5, 10 et 15 ml) afin de minimiser les variations liées au volume filtré.

Ces deux méthodes offrent des résultats d'abondance du même ordre de grandeur indiquant une bonne adéquation entre celles-ci. Les valeurs d'abondance en TEP, issues de la littérature, pourront donc être comparées quelle que soit la méthode utilisée. Cependant, l'abondance totale en TEP est relativement supérieure lorsque l'on applique la technique des lames blanches dépolies. Plusieurs hypothèses sont envisagées :

- 1) certaines particules (les plus petites) ne sont pas visualisées avec la méthode du FTF,
- 2) il y a perte de matériel lors du transfert vers la lame,
- 3) si les TEP ont tendance à s'agréger avec cette méthode, l'abondance deviendrait moindre tandis que la taille volumique individuelle augmenterait.

La qualité de l'image étant très bonne avec le FTF, il est peu probable que les plus petites TEP ne soient pas visualisées. La première hypothèse est donc peu plausible. Les résultats concernant le taux de transfert des TEP vers la lame, suggèrent qu'il y a perte d'une partie du matériel, ce qui explique au moins en partie, les valeurs inférieures liées à cette méthode. Enfin, la concentration volumique est supérieure avec la technique du FTF ce qui

corrobore la dernière hypothèse. Ainsi les hypothèses 2 et 3 expliquent l'abondance plus élevée en TEP lorsque la méthode des lames blanches dépolies est utilisée.

Une question se pose. Pourquoi la concentration volumique est-elle plus élevée avec la méthode du FTF ? Deux explications sont à évoquer. Premièrement, il s'agirait d'un artefact lié à la technique employée : la méthode du FTF entraînerait l'agrégation des particules, ou la méthode des LBD conduirait à une désagrégation des TEP. Cette dernière hypothèse semble peu probable ; en effet cette technique implique une simple filtration des TEP sans autre manipulation. En revanche, l'apposition d'une goutte de gélatine chauffée à 35°C sur la lame, avec la méthode FTF, pourrait modifier dans une certaine mesure la structure des TEP ou entraîner la migration des particules, ce qui aboutirait à la coagulation de certaines et donc à la diminution de l'abondance totale comme nous l'avons évoqué précédemment. Ceci pourrait expliquer également le manque de distribution aléatoire sur la lame et donc pourquoi les réplicats sont plus dispersés. La deuxième explication proposée est liée à la spécificité des techniques. On peut supposer que la méthode des LBD permet de mettre en évidence des TEP situées dans une gamme de taille inférieure, et inversement pour la méthode du FTF. Cependant, les deux méthodes sont basées sur une simple filtration et les filtres utilisés sont identiques. Il n'y a donc pas de contraintes liées à la gamme de taille étudiée.

La méthode utilisée ne modifie pas le spectre de taille des TEP. Celui-ci est décrit par une loi de puissance, caractéristique de la distribution des particules. Cependant la comparaison des spectres de taille avec la droite théorique montre une sous-estimation des petites particules, car pour des raisons techniques les particules inférieures à 2 μm sont plus difficiles à observer au microscope. Les TEP supérieures à 40 μm sont également sous-estimées. Étant rares, elles ne sont pas forcément présentes sur les champs d'observation ou dans le volume filtré, d'où leur sous-estimation. L'abondance ne serait donc pas un paramètre idéal de description des TEP car elle est dépendante des petites particules mais aussi des phénomènes éventuels d'agrégation et de désagrégation. A l'avenir les valeurs de concentrations volumiques seront privilégiées, car elles offrent des résultats plus globaux, indépendants de ces phénomènes. Dans la suite de ce manuscrit, l'abondance sera toutefois utilisée, notamment dans l'analyse des spectres de taille, car comme on l'a vu ceux-ci sont cohérents avec le modèle théorique (régressions significatives).

L'un des principaux avantages de la méthode FTF est la qualité de l'observation. En effet, le contraste de l'image est meilleur. L'absence de filtre évite les interférences

lumineuses. Ainsi la texture fibrillaire des TEP est observée, tandis qu'avec la méthode des lames blanches dépolies, les particules apparaissent plus diffuses.

Les contraintes liées aux expériences en mer nécessitent une méthode rapide et sans manipulations délicates. Or, la méthode du FTF demande un coût en temps plus élevé. La série de manipulations après la filtration n'est pas toujours facilement réalisable à bord lorsque les conditions météorologiques sont défavorables, contrairement à la méthode des LBD qui consiste en une simple filtration.

Globalement, ces deux méthodes n'ont pas montré de différences quant aux sites étudiés. Les conclusions issues de l'ensemble de ces expérimentations ne varient donc pas en fonction des conditions trophiques. L'utilisateur choisira l'une ou l'autre méthode en fonction de ses impératifs expérimentaux (précision, coût, temps) et non en fonction du site d'échantillonnage. Le Tableau I-VII récapitule les avantages et les limites de chacune des deux méthodes. Lors des recherches menées suite à cette étude, nous avons privilégié la méthode des lames blanches dépolies car elle offre une meilleure reproductibilité des résultats et permet des expérimentations moins longues.

Tableau I-VII : Récapitulatif des limites et des avantages des deux méthodes de mise en évidence des TEP.

Critères d'évaluation	Méthode Du « Filter-Transfer-Freeze »	Méthode des « Lames blanches dépolies »	Bilan	
			FTF	LBD
Préparations	+ longues (diverses solutions)	- longues	-	+
Filtration	Identique	Identique	=	=
Préparation des lames après la filtration	Manipulations + nombreuses + délicates (gel, transfert...) + longues (20-25 mn d'attente avant d'apposer la lamelle ...)	Peu de manipulations (filtre posé directement sur la lame), - délicat, + rapide	-	+
Observation				
Contraste	Meilleur	Moins bon	+	-
Texture	Texture fibrillaire préservée	Texture plus diffuse	+	-
Répartition	Rarement homogène	Distribution aléatoire	-	+
Analyses				
Reproductibilité	Moins bonne	Meilleure	-	+
Abondance relative	TEP - nombreuses	TEP + abondantes		
Volume relatif	TEP + grandes	TEP - grandes		
Coût				
En temps	+ long	- long	-	+
En argent	- cher	+ cher (les lames blanches dépolies présentent un coût élevé)	+	-
Aspect pratique	+ délicat	+ pratique lors d'expériences embarquées	-	+

4. Autres approches méthodologiques

L'utilisation de la spectrophotométrie (Passow & Alldredge 1995b) pour révéler la présence des TEP semble aussi un bon moyen de les quantifier de façon rapide. Il s'agit d'une méthode basée sur la détermination colorimétrique de la quantité de bleu Alcian complexée aux particules. Les études récentes privilégient cette technique (Ramaiah *et al.* 2001, Engel 2002, Garcia *et al.* 2002) et montrent que l'adsorption du bleu Alcian est une mesure directe de la masse des TEP (Engel & Passow 2001). Mais les résultats donnent une valeur équivalente en sucre (gomme de Xanthane), ne permettant donc pas d'estimer certaines caractéristiques, telles leur forme ou leur distribution de taille. De plus, cette méthode ne permet pas de différencier les TEP de l'ensemble du matériel organique polysaccharidique ce qui pose un problème quant à l'estimation de la quantité en TEP. En effet, l'approche colorimétrique mesure l'ensemble du matériel ayant adsorbé le colorant sans distinguer les TEP des mucilages attachés aux bactéries et au phytoplancton (Engel & Passow 2001). Cependant, pour des études à grande échelle, nécessitant de nombreux échantillonnages, cette technique d'analyse semi-quantitative permettant de travailler en routine devient appropriée.

L'utilisation de fluorochromes, marqueurs spécifiques des polysaccharides, fait également l'objet de recherches. Moreira-Turcq *et al.* (1998) ont estimé la concentration en particules en zones côtière et estuarienne Arctique, au moyen d'un cytomètre de flux. Cet appareil permet le comptage rapide de particules, basé sur leurs propriétés optiques. Parmi les sondes fluorescentes utilisées, la concavalline A conjuguée à l'isothiocyanate fluorescéine (Con A-FITC) est spécifique des hydrates de carbone tels que le glucose et le mannose. Les auteurs cités précédemment ont évoqué la présence de TEP lors de ces analyses sans toutefois pouvoir les différencier des autres particules organiques. Cette méthode offre donc une estimation globale de l'ensemble des particules composées de sucres. De plus, seules les plus petites classes de taille sont considérées (0,2-10 μm) alors que les TEP peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres. La sous-estimation du leur nombre est un inconvénient supplémentaire à cette méthode.

Si l'utilisation du cytomètre de flux ne paraît pas encore adéquat, il est toutefois possible d'utiliser la microscopie à épifluorescence pour analyser les particules organiques liées aux fluorochromes. De cette manière, le comptage n'est plus global mais spécifique à chaque classe de particules et la gamme de taille n'est pas limitée par les contraintes liées à l'appareil. Schumann & Rentsch (1998) ont développé une technique de marquage au 5-(4,6-

dichlorotriazynil) aminofluorescéine (DTAF) qui se lie de façon covalente aux polysaccharides à température ambiante quand le pH est inférieur à 9. Dans ces conditions, la matière organique n'est pas dénaturée. Le DTAF marque de façon efficace les agrégats gélatineux et donc probablement les TEP. La visualisation directe au microscope permet alors une analyse quantitative précise. Cependant l'inconvénient majeur est la non-spécificité du marqueur ; en effet, celui-ci se lie également aux protéines. A l'avenir, la mise au point d'une technique de double marquage, au moyen de sondes fluorescentes spécifiques des polysaccharides, couplées à une coloration au bleu Alcian pourra être une voie alternative pour différencier les TEP des autres particules de façon précise.

5. Conclusion

Nous avons comparé l'efficacité de deux méthodes de mise en évidence des TEP, la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF) et la méthode des lames blanches dépolies (LBD).

➡ Globalement, les deux méthodes offrent des résultats en bonne adéquation. Cependant, l'abondance totale en TEP est relativement inférieure lorsque la méthode du FTF est utilisée. L'une des explications est la perte d'une partie du matériel particulaire lors du transfert vers la lame. De plus, la concentration volumique est supérieure avec cette méthode. Celle-ci pourrait entraîner dans une certaine mesure l'agrégation des TEP expliquant aussi pourquoi l'abondance totale est plus faible avec la méthode FTF.

➡ La méthode des lames blanches dépolies offre une meilleure reproductibilité des résultats. Elle est plus simple et nécessite moins de manipulations de l'échantillon d'eau de mer, limitant ainsi l'altération de la distribution des particules. La répartition homogène est en soit un critère de méthode non-agrégative.

➡ La qualité de l'observation est meilleure avec la méthode du FTF.

➡ Les distributions de taille des TEP obéissent à une loi de puissance décroissante, loi générale en granulométrie. Les spectres ont les mêmes caractéristiques quelle que soit la méthode utilisée avec une sous-estimation des particules inférieures à 2 μm et des particules supérieures à 40 μm .

➡ Les résultats ne présentent pas de différences majeures selon le site étudié. La richesse en TEP de l'échantillon n'influence pas fortement l'efficacité des méthodes. Cependant, les trois sites analysés lors de ce travail présentaient des valeurs élevées en TEP. La confrontation de ces deux méthodes sur des échantillons très pauvres en matériel particulaire (prélevés en zone profonde, -130 m et -500 m à DYFAMED) sera réalisée prochainement.

➡ Le volume filtré a une grande influence sur les résultats. Une courbe de calibrage est nécessaire avant chaque nouvelle étude. L'expérimentateur établira une courbe-étalon et choisira les volumes offrant des valeurs stables et une bonne reproductibilité des répliqués.

➡ La méthode des lames blanches dépolies sera privilégiée dans la suite de ce travail (à partir de l'étude en milieu contrôlé).

Chapitre II

Distribution saisonnière des TEP en Méditerranée Nord-Occidentale.

Relations avec les conditions trophiques et hydrologiques

A. Introduction	43
B. Matériels & Methodes	44
1. Sites d'étude.....	44
2. Echantillonnages	45
3. Mise en évidence des TEP	46
4. Distribution de taille des TEP	46
C. Résultats	47
1. Caractéristiques hydrologiques de la colonne d'eau	47
a) Site DYFAMED	47
b) Point B.....	47
2. Distribution saisonnière des TEP	49
3. Distribution de taille des TEP	52
D. Discussion	54
1. Comparaisons avec d'autres sites	54
2. Comparaisons entre le site côtier et le site océanique.....	54
3. Processus gouvernant la dynamique des TEP à DYFAMED	56
a) Origines du pool de TEP	56
b) Pourquoi y a-t-il accumulation de TEP durant la période estivale et quelles en sont les conséquences ?.....	58
c) Quel est le devenir du pool de TEP ?	60
4. Conclusion	60

A. INTRODUCTION

L'étude des particules exopolymériques transparentes (TEP) fait l'objet d'une attention grandissante depuis les dix dernières années (Alldredge *et al.* 1993, Engel 2000, Passow 2002b). Les travaux précédents ont révélé leurs fortes implications dans les processus biogéochimiques des milieux aquatiques. Mari et Burd (1998) et Passow *et al.* (2001) ont décrit leur distribution saisonnière en milieu eutrophe (respectivement au Kattegat et en zone côtière Californienne). Mais aucune étude ne fait état d'un suivi annuel des caractéristiques des TEP en zone oligotrophe. Or, dans ce type de système où règnent des conditions limitantes en sels nutritifs pour le phytoplancton, il existe une forte production de polysaccharides extracellulaires et notamment de particules exopolymériques transparentes (Penna *et al.* 1999, Corzo *et al.* 2000). En mer Adriatique par exemple, les TEP sont présentes en forte abondance (Schuster & Herndl 1995) et peuvent représenter jusqu'à $769 \mu\text{gC l}^{-1}$, soit $64 \mu\text{M-C}$ (Engel & Passow 2001). Dans cette zone, ces particules peuvent être à l'origine de fortes accumulations d'agrégats et de cellules de diatomées, entraînant à moyen terme la persistance de grands mucilages gélatineux (Alldredge & Crocker 1995). La mer Ligure est globalement oligotrophe et limitée en phosphore en particulier en été (Béthoux *et al.* 1998). En outre, cette période est caractérisée par une accumulation de carbone organique dissous en surface (Copin-Montégut & Avril 1993, Avril 2002) qui pourrait induire la formation éventuelle de TEP. L'ensemble de ces caractéristiques laisse présumer que ces particules pourraient représenter une composante majeure du système pélagique de la méditerranée Nord-Occidentale.

L'objectif principal de cette étude est donc de décrire les variabilités saisonnières de l'abondance et des caractéristiques des TEP en deux sites d'étude de la mer Méditerranée Nord-Occidentale, l'un côtier, l'autre océanique. Cette étude nous permettra de comprendre comment les processus hydrologiques, chimico-physiques et biologiques gouvernent la formation et le devenir de ces particules. Nous tenterons ainsi d'évaluer l'importance de ce pool de matière dans les processus pélagiques en Méditerranée Nord-Occidentale.

B. MATERIELS & METHODES

1. Sites d'étude

Cette étude s'est déroulée en Méditerranée Nord-Occidentale de février 1999 à février 2000 en deux sites (Figure II-1) :

- *Le Point B* (43°41'10''N, 07°19'0''E) : il s'agit d'un site côtier situé à l'entrée de la rade de Villefranche-sur-Mer (France). Les vents dominants sont de secteur Est correspondant aux dépressions séjournant en Mer Ligure. La rade est constituée d'un seuil séparant un bassin peu profond au Nord (13 m) d'une forte pente plongeant dans le canyon de Villefranche. La proximité de fonds importants (> 500 m) au large de la rade permet une remontée d'espèces planctoniques rares, d'où une richesse et une diversité très importantes. Les mesures hydrologiques au Point B ont débuté en 1957. Actuellement, la surveillance de l'hydrologie et du plancton s'intègre dans le réseau d'observation des stations marines de l'INSU (Institut National des Sciences de l'Univers) et du programme SOMLIT (Surveillance d'Observation en Milieu Littoral). Ces informations sont disponibles sur le site <http://www.obs-vlfr.fr/Rade/site.htm>. Cette baie est sujette à l'influence du courant Liguro-Provençal, courant cyclonique circulant de l'est vers l'ouest le long de la côte. Au Point B, l'eau est donc renouvelée continuellement (Nival & Corre 1976). La vitesse moyenne des courants près de la côte peut atteindre 20 cm s⁻¹ (Béthoux *et al.* 1988).

- *La station DYFAMED* (43°25'2''N, 07°51'8''E) : elle est localisée à 28 milles de la côte sur la radiale Nice-Calvi. Elle se situe dans la zone centrale de la mer Ligure. Le front Ligure agit telle une barrière physique rendant les courants horizontaux négligeables (Béthoux *et al.* 1988, Sournia *et al.* 1990). Ce site est ainsi caractérisé par des courants advectifs verticaux prépondérants dont la vitesse en hiver peut atteindre 10 à 15 cm s⁻¹. Durant la période de stratification estivale, la vitesse moyenne est de 0,2 cm s⁻¹ (Béthoux & Prieur 1983). Sa relative grande distance de la côte rend l'influence des eaux continentales négligeables. Ce site est donc considéré comme une zone océanique. Les caractéristiques saisonnières hydrologiques et biogéochimiques y sont largement documentées car il s'agit d'une station de référence du programme JGOFS-France (Joint Global Ocean Flux Study) depuis 1989.

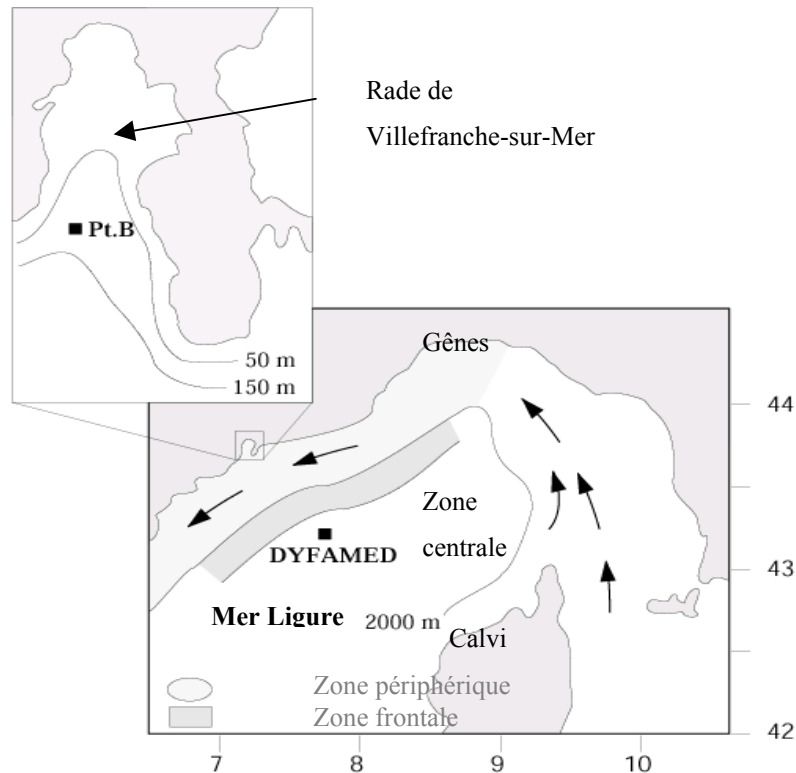


Figure II-1 : Sites d'échantillonnages (Point B et DYFAMED). Les flèches représentent le courant Ligure.

2. Echantillonnages

Les échantillonnages pour l'analyse des TEP ont eu lieu chaque mois durant une année, aux deux sites. Les prélèvements ont été effectués au moyen d'une bouteille Niskin de 30 litres (General Oceanics Inc™. United states). Les échantillonnages ont été effectués à la profondeur du maximum de chlorophylle *a* (Depth Chlorophyll *a* Maximum, DCM) déterminée au préalable par un fluorimètre couplé à une sonde CTD (Seabird™ SBE 25). Les profondeurs d'échantillonnage pour les pigments et les sels nutritifs sont 5, 10, 30, 50 et 75 m au Point B et 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 110 et 130 m à DYFAMED. Les concentrations en nitrates et en phosphates ont été déterminées grâce à un autoanalyseur selon la méthode de Tréguer et Le Corre (1975). Les concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*) ont été mesurées au Point B par spectrophotométrie et à DYFAMED par chromatographie liquide à haute pression (HPLC), selon la méthode de Vidussi *et al.* (1996). Les données de température, de sels nutritifs et de pigments sont issues des bases de données SOMLIT et DYFAMED-JGOFS-France (années 1999-2000).

3. Mise en évidence des TEP

Les échantillons pour la mise en évidence des TEP ont été préparés frais, à bord ou dans les deux heures suivant le prélèvement afin d'éviter de congeler ou de fixer l'eau de mer au formol. Le formol seul n'interfère pas avec le bleu Alcian (Passow & Alldredge 1994). Cependant, puisque la capacité de liaison du bleu Alcian avec les polysaccharides dépend du pH (Parker & Diboll 1966), nous avons préféré garder les échantillons frais. La détermination des TEP a été réalisée selon la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). L'ensemble du protocole d'observation et de comptage des particules est détaillé au chapitre I.

4. Distribution de taille des TEP

La distribution de taille des TEP obéit à une relation de puissance décrite au chapitre I. Rappelons cependant qu'elle se formule ainsi :

$$dN/d(d_p) = k d_p^{\hat{\delta}} \quad (7)$$

où dN est le nombre de particules par unité de volume ayant un diamètre compris entre d_p et $[d_p + d(d_p)]$. d_p est le diamètre de sphère équivalente. La constante k et la pente $\hat{\delta}$ sont déterminées à partir des droites de régression de $\log[dN/d(d_p)]$ versus $\log(d_p)$.

Afin d'estimer l'influence des sites et des saisons sur la distribution de taille des TEP, ces droites de régression ont été comparées par le biais d'une analyse de covariance (ANCOVA ; logiciel SYSTAT 5.2.1). Les données ont été classées en trois groupes correspondant à la période hivernale, printanière et stratifiée (été + automne). Les TEP inférieures à 2 μm et les TEP supérieures à 17 μm ont été omises de cette analyse. Les données du mois d'octobre n'ont pas été incluses car le spectre de taille présentait des anomalies, probablement liées à un artefact méthodologique. Les conditions d'application ont été vérifiées afin de valider l'utilisation d'un tel test paramétrique. Les échantillons sont indépendants. La normalité des résidus a été soumise à un test de Lilliefors ($p > 0,05$; $n = 137$), l'hypothèse d'égalité des variances (homoscédasticité) est confirmée par le test de Levene ($p > 0,05$; $n = 137$).

C. RESULTATS

1. Caractéristiques hydrologiques de la colonne d'eau

a) Site DYFAMED

En hiver, il existe un fort mélange vertical caractérisé par une augmentation de la densité des eaux de surface, et une homogénéisation des températures sur l'ensemble de la colonne d'eau (13°C jusqu'à 200 m, Figure II-2a). En été, la colonne est stratifiée avec une pycnocline et une thermocline marquées entre 20 et 45 m de profondeur qui isolent les eaux de surface de celles plus profondes. La transition entre ces deux périodes a lieu durant le printemps et le début de l'hiver. La période hivernale est relativement riche en sels nutritifs (avec des concentrations en nitrates et en phosphates respectivement de 3-4 et 0,15-0,20 $\mu\text{mol l}^{-1}$) dans la zone de surface (Figure II-2c). Du mois d'avril à la fin de l'automne, les eaux de surface deviennent pauvres en sels nutritifs. Les concentrations en nitrates descendent sous 0,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ et les phosphates atteignent des valeurs inférieures au seuil limite de détection. La distribution saisonnière en chlorophylle *a* est caractérisée par une première floraison printanière (2,9 $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$) au début du mois de mars dans la zone mélangée de surface et une seconde en juin au niveau de la pycnocline (jusqu'à 1,9 $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$, Figure II-2e).

b) Point B

En hiver, la colonne d'eau est mélangée et homogène avec une température moyenne de 13°C (Figure II-2b). De mai à septembre 1999, elle devient stratifiée avec une thermocline bien établie à environ 30 m de profondeur. La concentration en nitrates est élevée au mois de mars avec un maximum de 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ suivi par une floraison (jusqu'à 1,2 $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$; Figure II-2d,f). Durant l'été, la concentration en nitrates descend sous un seuil de 0,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$, celle de phosphates est inférieure à 0,09 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Durant cette période, la concentration en chlorophylle *a* est inférieure à 0,3 $\mu\text{g l}^{-1}$ en surface et varie de 0,3 à 0,6 $\mu\text{g l}^{-1}$ sous la thermocline, aux profondeurs d'échantillonnages des TEP. Fin décembre, il y a une remontée des sels nutritifs depuis les couches profondes vers la surface, suivie d'une augmentation de la concentration en chlorophylle *a* atteignant des valeurs de l'ordre de 0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$.

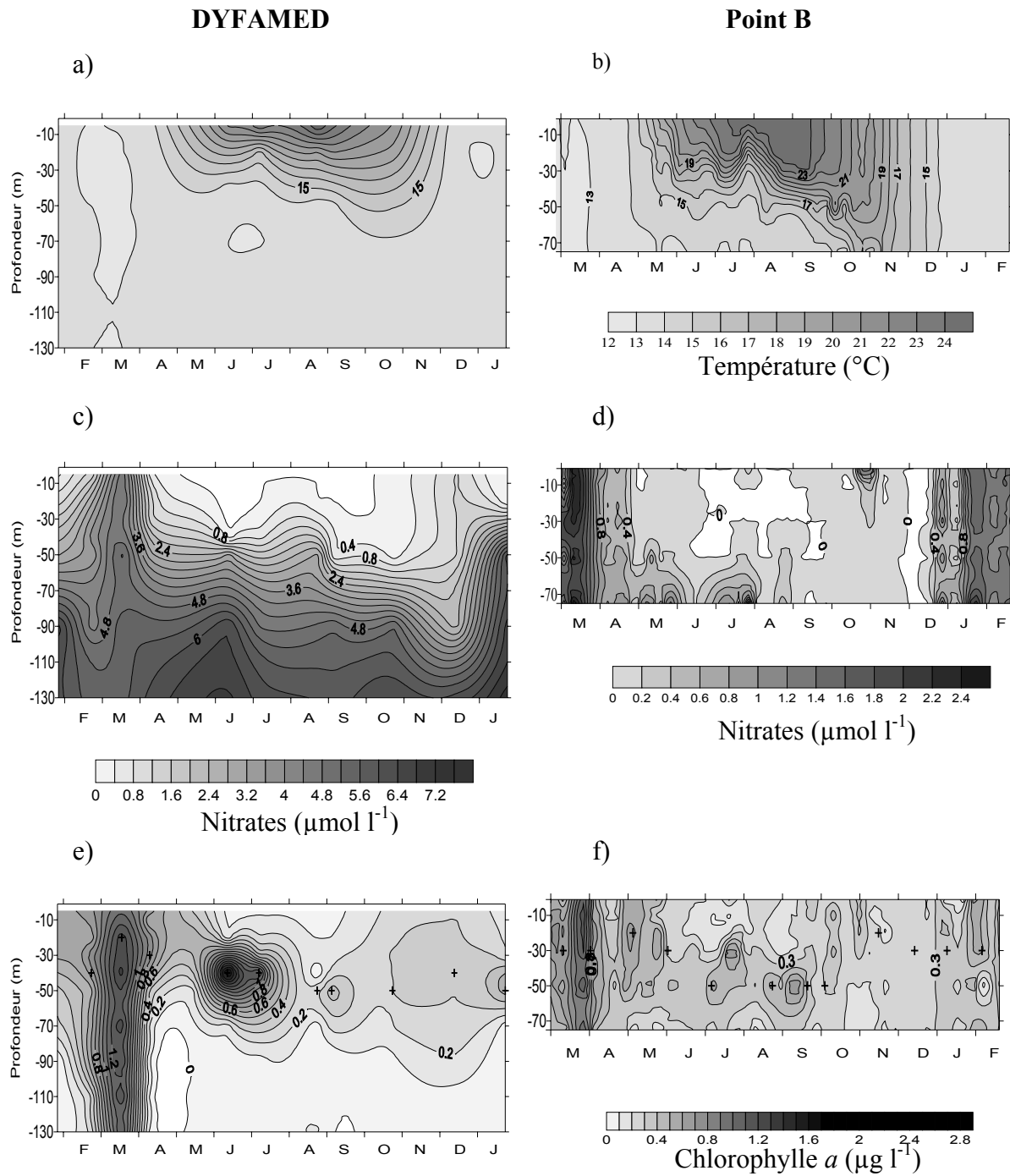


Figure II-2 : Variations saisonnières de la température (a, b), des nitrates (c, d) et de la chlorophylle *a* (e, f ; les croix illustrent les profondeurs d'échantillonnages des TEP). Les valeurs sont issues de la base de données DYFAMED-PROOF-JGOFS-France et du programme INSU-SOMLIT (1999-2000). Les échelles sont différentes pour les nitrates.

2. Distribution saisonnière des TEP

Les particules exopolymériques transparentes sont présentes durant la totalité de l'année aux deux stations (Figure II-3). Globalement, le site océanique (DYFAMED) est plus riche en TEP que le site côtier (Point B). De février à mai, l'abondance en TEP est relativement faible (inférieure à $0,35 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$) aux deux sites. A DYFAMED la concentration en TEP augmente fortement en juin pour atteindre des valeurs maximales de l'ordre de $2,2 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$ et reste relativement élevée jusqu'en automne. Au Point B, l'abondance en TEP commence à augmenter plus tardivement, et persiste également à de relatives fortes valeurs jusqu'en septembre, atteignant un maximum de $0,55 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$ en juillet. Aux deux sites, les concentrations diminuent à l'automne pour rejoindre des valeurs similaires à l'hiver précédent.

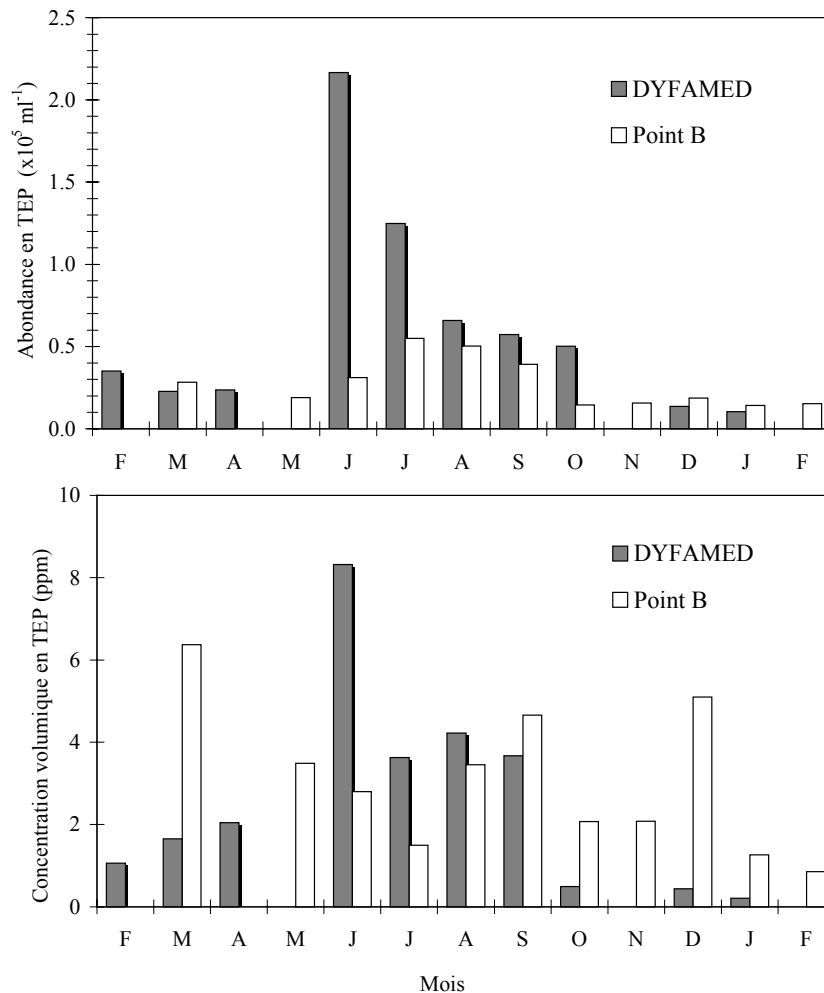


Figure II-3 : Variations saisonnières de l'abondance en TEP ($\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) et de leur concentration volumique (ppm) de février 1999 à février 2000, à DYFAMED (barres grisées) et au Point B (barres claires). Les données manquantes en mai et en novembre correspondent à l'annulation des missions en mer pour cause de mauvaises conditions météorologiques.

A DYFAMED, la concentration volumique totale des TEP suit la même évolution que l'abondance, avec des valeurs minimales de février à mars (de 1,1 à 2,0 ppm), de fortes valeurs de juin à septembre (jusqu'à 8,3 ppm en juin) et des valeurs diminuant après la période de stratification (de 0,5 à 0,2 ppm). Au mois d'octobre, l'abondance en TEP est relativement élevée tandis que la concentration volumique diminue fortement. Ceci indique la présence de relativement plus de petites particules que les mois précédents. La Figure II-5 offre une représentation globale de la distribution saisonnière des TEP à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*. A DYFAMED, on observe effectivement une augmentation du pool de TEP à partir du printemps, une persistance durant la période stratifiée, et une diminution à partir de septembre. Au point B, la distribution saisonnière des TEP, en termes de volume, est relativement moins marquée (Figure II-3). On observe parfois des concentrations volumiques élevées (6,3 ppm en mars, 5,1 ppm en décembre) alors que l'abondance est relativement basse. Durant ces périodes, les particules peuvent être très grandes (plus de 70 μm de diamètre, Figure II-5). A l'inverse, en juillet, le volume total des TEP diminue, tandis que l'abondance augmente, signifiant la présence relative de davantage de petites particules par rapport aux mois de juin.

A DYFAMED, l'abondance en TEP est positivement corrélée à la concentration en chlorophylle *a* (Figure II-4). Cette corrélation est d'autant plus forte avec les TEP inférieures à 2 μm ($R^2 = 0,65$; $n = 10$; $p < 0,01$). En effet, en juin, durant la seconde floraison phytoplanctonique, les petites TEP sont fortement abondantes (elles représentent 46% en termes de nombre de l'ensemble des TEP), tandis qu'elles deviennent moins nombreuses durant la période stratifiée pauvre en chlorophylle *a*. Au Point B, les résultats ne révèlent pas de corrélation entre ces deux paramètres.

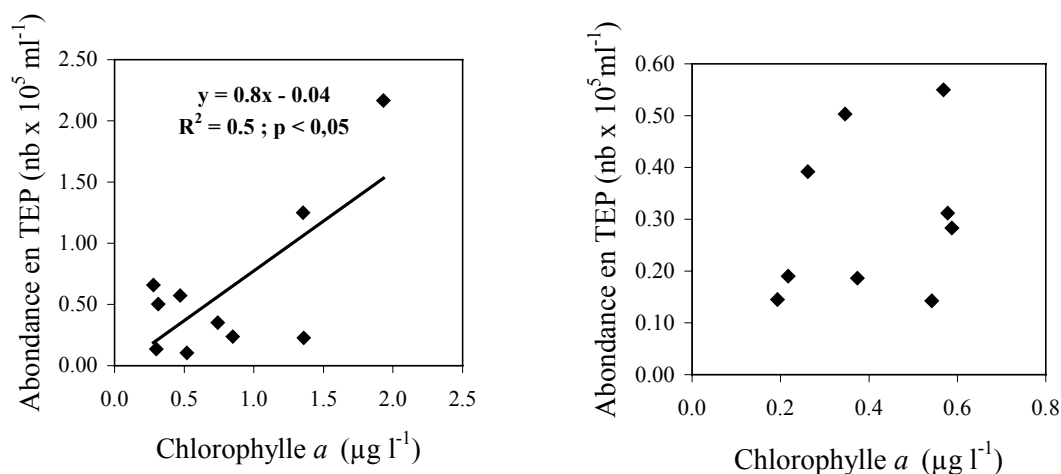


Figure II-4 : Abondance en TEP (nb x10⁵ TEP ml⁻¹) en fonction de la concentration en chlorophylle *a* (μg l⁻¹), à DYFAMED (gauche) et au Point B (droite) sur la totalité de l'année, à la profondeur du maximum de chlorophylle *a* (DCM).

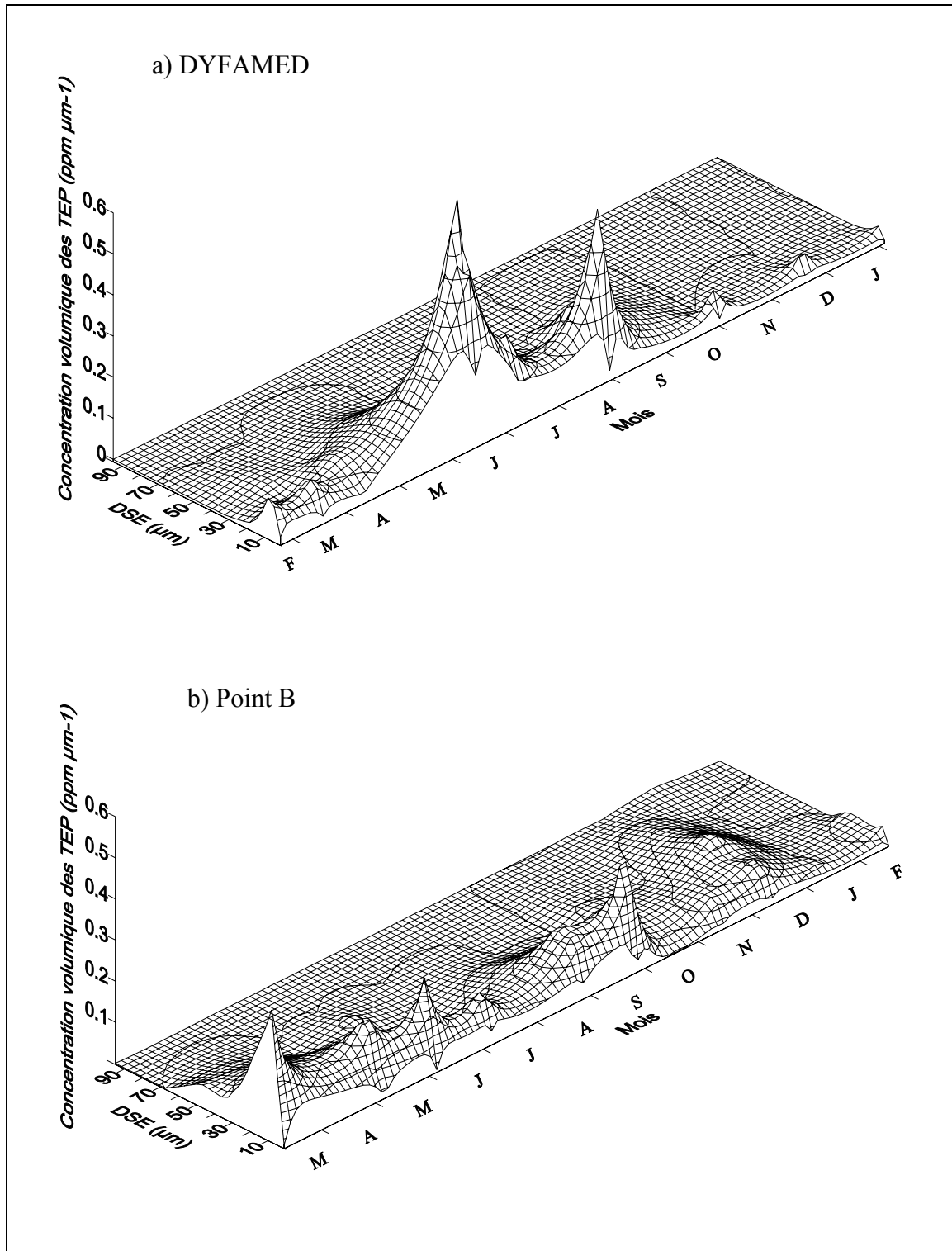


Figure II-5 : Représentation tri-dimensionnelle de la concentration volumique en TEP (normalisée par la largeur de la classe de taille), en fonction de leur diamètre de sphère équivalente durant l'année d'étude, à DYFAMED (a) et au Point B (b), à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*.

3. Distribution de taille des TEP

Aux deux sites, les spectres de taille des TEP obéissent à une loi de puissance. Les droites de régression sont significatives durant la totalité de l'année sauf au mois d'octobre à DYFAMED (Figure II-7). Les petites classes de taille ($< 2 \mu\text{m}$), ainsi que les plus grandes semblent être sous-estimées. Comme on l'a vu au chapitre I, cette déviation au modèle théorique est probablement due à un artéfact méthodologique. Les résultats de l'analyse de covariance montrent que les différences entre sites ne sont pas significatives ($p > 0,05$; ddl = 1 / 134). Cependant, les différences entre saisons sont fortement significatives ($p < 0,001$; ddl = 2 / 125). La Figure II-6 illustre les résultats de l'analyse de covariance. Les pentes des droites de régression sont égales à $-2,13 \pm 0,12$ au printemps, $-2,85 \pm 0,11$ durant la période stratifiée et $-3,20 \pm 0,14$ en hiver.

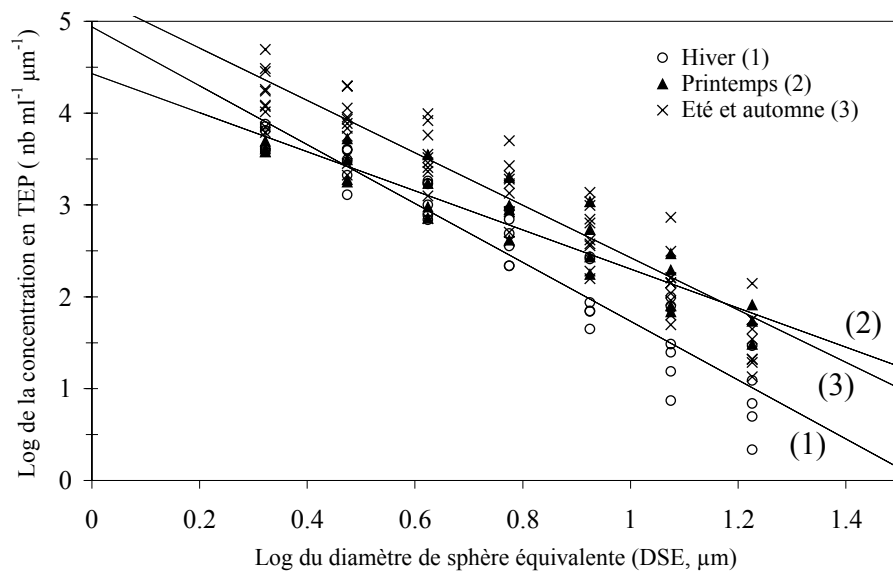


Figure II-6 : Spectres de taille des TEP issus de l'analyse de covariance. Les données de DYFAMED et du Point B ont été compilées car elles ne présentent pas de différences significatives ($p = 0,19$; $n = 137$). Les droites de régression (1), (2) et (3) correspondent respectivement à l'hiver, au printemps et à l'été+automne (*i.e.* la période stratifiée).

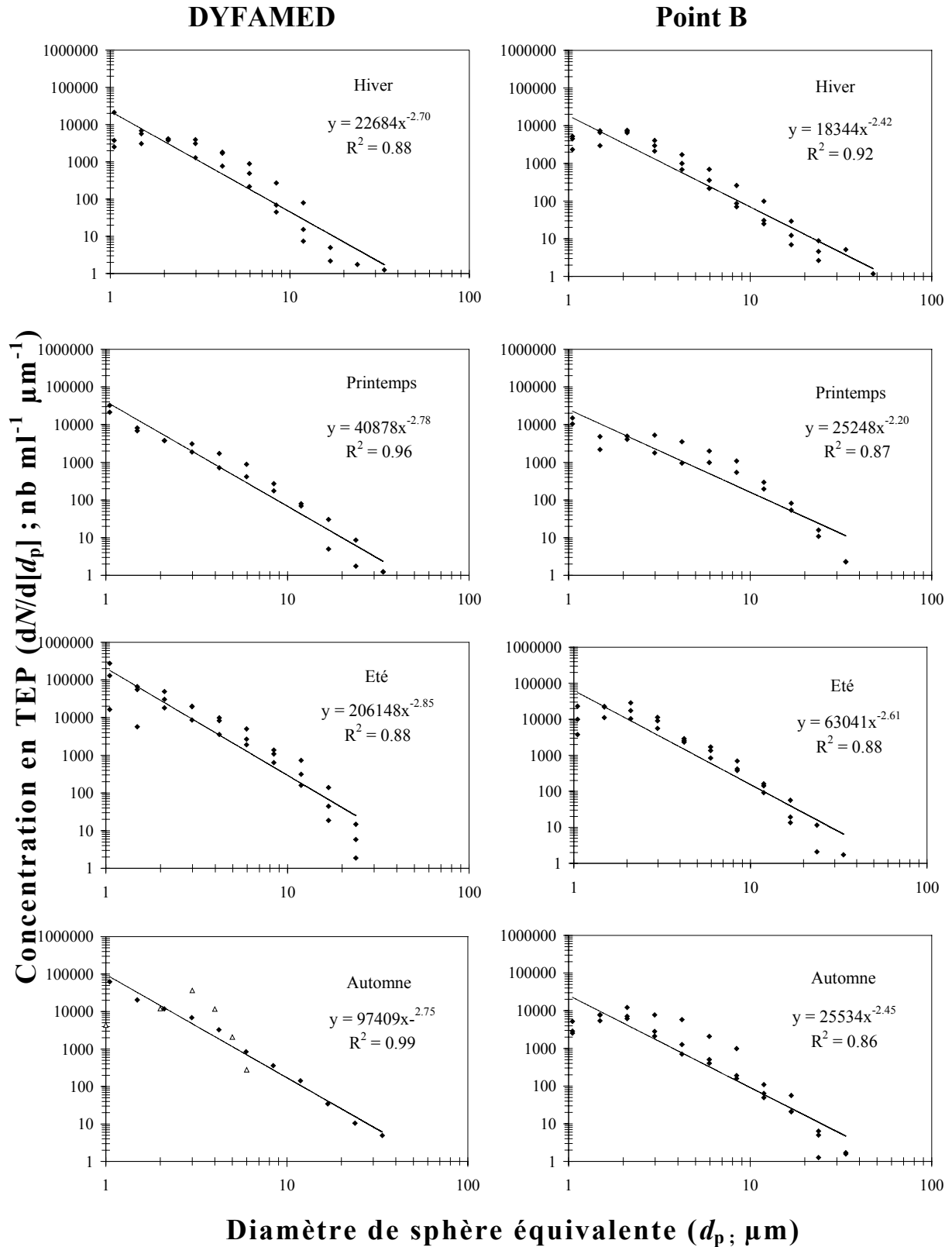


Figure II-7 : Spectres de taille des TEP après transformation log-log, à DYFAMED (gauche) et au Point B (droite). Les droites de régression ($dN/d[dp] = kdp^{\delta}$) ont été réalisées en utilisant l'ensemble des données sauf en automne (symboles triangulaires = octobre). Elles sont significatives au seuil de 0,001.

D. DISCUSSION

1. Comparaisons avec d'autres sites

En Méditerranée nord-occidentale, les TEP sont présentes en forte abondance durant l'année entière et aux deux sites (de 2×10^4 à $2,2 \times 10^5$ TEP ml^{-1}). Les études menées dans différents systèmes jusqu'en 1995 rapportent des concentrations de 1 à 3 ordres de magnitude inférieures. Par exemple, Passow et Alldredge (1994) ont mis en évidence de 4 à 5×10^3 TEP ml^{-1} dans des eaux côtières de Californie et moins de 10 ml^{-1} en un site océanique profond des Bermudes. Dans la partie nord de la mer Adriatique, Schuster et Herndl (1995) ont observé de $0,6 \times 10^3$ à $2,4 \times 10^3$ TEP ml^{-1} en deux stations, respectivement oligotrophique et eutrophique. Les fortes valeurs trouvées dans notre étude reflètent une amélioration de la méthodologie utilisée. En effet, contrairement aux auteurs cités précédemment, nous avons observé les TEP à trois grossissements successifs et les comptages ont été réalisés au moyen d'un système d'analyse d'images selon la méthode de Mari et Burd (1998) permettant une bonne visualisation des particules inférieures à $3 \mu\text{m}$. Les abondances en TEP en Méditerranée sont comparables à celles trouvées dans le Kattegat (jusqu'à $3,8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$; Mari & Burd 1998) et dans un ria sub-arctique japonais (jusqu'à $3,4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$; Ramaiah *et al.* 2001). Or ces sites sont fortement eutrophiques ($12 \mu\text{g Chlo } a \text{ l}^{-1}$ durant la floraison printanière) tandis que la Méditerranée Nord-Occidentale est un milieu oligo-mésotrophique ($2,9 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$ au maximum en mars à DYFAMED). Nos résultats confirment que la formation des TEP est davantage liée à l'activité du phytoplancton qu'à sa biomasse, et qu'elle est intense en conditions trophiques limitantes en sels nutritifs. Les particules exopolymériques transparentes font donc partie intégrante des systèmes oligotrophes.

2. Comparaisons entre le site côtier et le site océanique

Globalement, la distribution saisonnière des TEP est plus prononcée à DYFAMED comparativement au Point B. L'hydrologie à la station côtière est plus complexe puisque ce site est influencé par les vents côtiers et par le courant Ligure, tandis qu'à la station océanique seuls les courants advectifs verticaux sont prédominants, facilitant la description des processus. Par exemple, à DYFAMED, on observe une corrélation positive entre la concentration en chlorophylle *a* et l'abondance en TEP, tandis qu'à la station côtière, il n'y a

pas de corrélation entre ces deux paramètres. Sachant que la source principale des particules exopolymériques transparentes est l'exsudation de précurseurs colloïdaux par le phytoplancton (Alldredge *et al.* 1993), on pouvait s'attendre à une relation positive entre les producteurs primaires et les TEP. Le Point B est soumis à l'influence des vents et des courants, les TEP et leurs sources sont donc tributaires d'une cinétique supplémentaire liée aux courants, compliquant la description de la dynamique générale. Considérant les fortes variations des concentrations volumiques au Point B, avec des valeurs pouvant être parfois élevées, il semble que les processus d'agrégation et de désagrégation des TEP soient plus intenses à ce site. Ceci confirme le rôle plus complexe de l'hydrologie. Les forts volumes de TEP consécutivement à l'efflorescence de mars pourraient être le reflet de processus d'agrégations entre ces particules et les cellules algales.

Le spectre de taille des TEP est cohérent avec le modèle de coagulation (loi de puissance, valeur des pentes d'environ 3 ; Mc Cave 1984) confirmant leur origine, à savoir la coagulation de précurseurs colloïdaux (Mari & Burd 1998). Le spectre de taille des TEP n'est pas significativement différent entre les sites. Leur mode de formation n'est donc pas influencé par les différences hydrologiques, tout au moins dans cette étude. Le spectre de taille est principalement affecté par les variations saisonnières. Aux deux sites confondus, la pente des droites de régression décrivant les spectres de taille des TEP est maximale en hiver comparativement aux autres saisons. Cela signifie qu'on trouve davantage de petites particules relativement aux plus grandes en cette période. En hiver, les vents induisent une forte turbulence, entraînant l'homogénéisation de la colonne d'eau (Figure II-2). De plus il n'y a pas de forte formation de TEP en cette période, expliquant pourquoi les TEP sont relativement plus petites en hiver.

Les TEP sont présentes en forte abondance aux deux sites durant l'année entière, et la distribution saisonnière montre globalement une augmentation du pool de TEP à partir du printemps et une persistance de ce pool durant la période estivale. Nos résultats suggèrent que la dynamique des TEP est complexe et influencée par de nombreux paramètres physiques, chimiques et biologiques. Ceux-ci sont largement documentés à DYFAMED car il s'agit d'une station de référence du programme JGOFS-France. Disposant d'une base de données importante, en particulier pour l'année 1999-2000, nous allons tenter de décrire les processus gouvernant la dynamique des TEP au site océanique.

3. Processus gouvernant la dynamique des TEP à DYFAMED

a) Origines du pool de TEP

En Méditerranée nord-occidentale l'année peut-être divisée en deux saisons hydrologiques : une période mésotrophique durant laquelle les forts mélanges hivernaux entraînent une remontée de sels nutritifs depuis les couches profondes, induisant une floraison à la fin de l'hiver (Minas *et al.* 1988), et une période oligotrophique, du printemps à la fin de l'été, durant laquelle la colonne d'eau devient stratifiée et pauvre en sels nutritifs (Béthoux *et al.* 1988). Le statut trophique de la Méditerranée Nord-Occidentale a été également décrit via l'utilisation du rapport Fp (Claustre 1994). Celui-ci représente le rapport entre la biomasse des pigments des grandes espèces phytoplanctoniques et la biomasse des pigments totaux. En 1999, le régime mésotrophique était caractérisé par un fort rapport Fp de 80% à DYFAMED, expliqué par une efflorescence de diatomées, intense en mars. En effet, les concentrations en fucoxanthine atteignaient 100 mg m^{-2} , alors que la moyenne à ce site est de $7,1 \text{ mg m}^{-2}$ (Figure II-8 ; Marty *et al.* 2002).

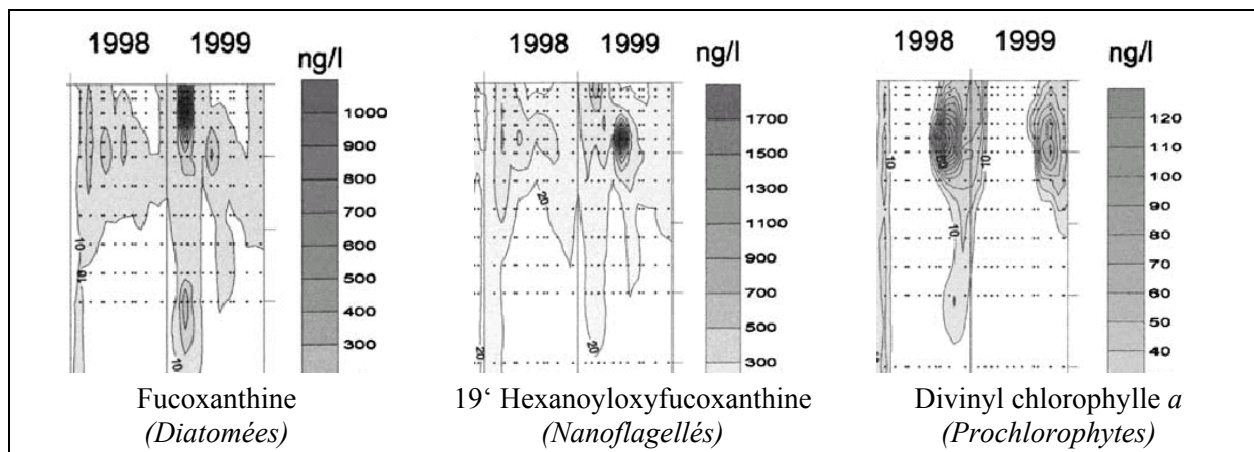


Figure II-8 : Concentrations en pigments biomarqueurs de groupes phytoplanctoniques (ng l^{-1}) au site DYFAMED, de 1997 à 1999, de 0 à 250 m de profondeur. Ces graphiques sont issus de Marty *et al.* (2002).

Généralement, les floraisons de diatomées sont associées à de fortes concentrations en TEP (Passow & Alldredge 1994, Logan *et al.* 1995, Mari & Burd 1998). Pourtant, nous avons observé relativement peu de TEP juste après la floraison de mars à DYFAMED. Nous suggérons que les TEP formées durant cette période se sont agrégées aux diatomées, permettant ainsi une sédimentation rapide de l'ensemble du matériel. En effet, ces particules, ayant un fort coefficient d'adhésion, elles accélèrent les processus d'agrégation et de sédimentation des grandes cellules algales telles les diatomées (Kjørboe & Hansen 1993,

Logan *et al.* 1995, Passow *et al.* 2001). De plus, Miquel et La Rosa (1999) ont observé des flux particuliers exceptionnels en février-mars 1999 à DYFAMED, corroborant notre hypothèse (jusqu'à $729 \text{ mg m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ alors que le flux moyen de 1987 à 1999 est de $81 \text{ mg m}^{-2} \text{ j}^{-1}$). Les fortes concentrations volumiques des TEP observées au Point B en mars, en concomitance avec l'efflorescence phytoplanctonique, suggèrent qu'il y a bien une forte production de particules exopolymériques en cette période. Il semble que la dynamique du site contrôle le devenir du pool de TEP (persistance en surface ou exportation vers les zones profondes).

Les conditions oligotrophiques ont débuté à la fin du printemps avec la stratification de la colonne d'eau, marquée par une thermocline à 40 m de profondeur isolant les eaux superficielles du reste de la colonne d'eau, limitant ainsi les échanges verticaux. Durant cette période, le rapport Fp est descendu à 15% avec une floraison (en juin) dominée par des nanoflagellés, composés majoritairement de prymnésiophyces (Figure II-8 ; Marty *et al.* 2002). Les fortes abondances en TEP (liées majoritairement à une forte abondance des petites particules) observées en cette période sont probablement causées par cette efflorescence. En effet, les nanoflagellés sont à l'origine de la formation importante de TEP (Riebesell *et al.* 1995). Une autre hypothèse, proposée plus récemment par Fukuda et Koike (2000), évoque la forte agrégation des colloïdes en particules par les courants micro-turbulents issus de la nutrition des nanoflagellés. En été, bien que le phytoplancton soit rare dans la zone de surface, on observe de fortes concentrations en TEP (en particulier en août). Cette période coïncide avec une accumulation de carbone organique dissous (COD) à DYFAMED (Copin-Montégut & Avril 1993, Avril 2002, Figure II-9). Du printemps jusqu'à l'été, le phytoplancton et les bactéries exsudent de larges quantités de matière organique dissoute (MOD) riche en carbone, qui s'accumule continuellement en surface avec des valeurs maximales de $82 \mu\text{M-C}$ à 34 m de profondeur en août et de $90 \mu\text{M-C}$ en surface en septembre (Avril 2002). Comme le pool de TEP montre une distribution saisonnière similaire à celle de la matière organique dissoute, notre étude suggère que ce pool riche en carbone est à l'origine de la formation des TEP.

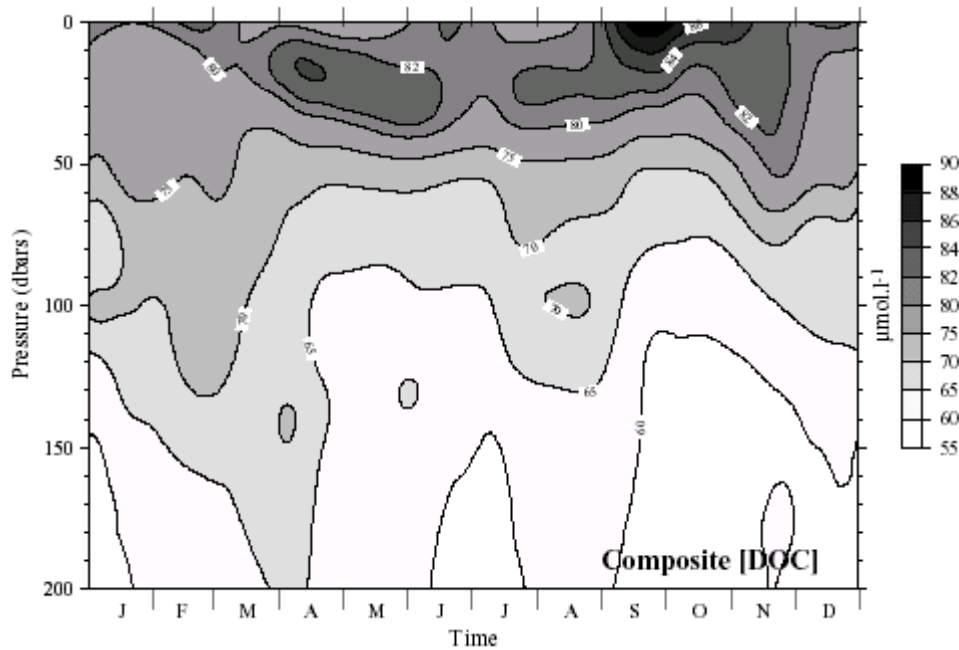


Figure II-9 : Distribution du carbone organique dissous (COD ; μM) sur les 200 premiers mètres de la colonne d'eau à DYFAMED durant une année théorique (basée sur les résultats de 4 années de mesures 1991-1994). Graphique issu de Avril (2002).

b) Pourquoi y a-t-il accumulation de TEP durant la période estivale et quelles en sont les conséquences ?

Tandis qu'il y a une légère diminution de l'abondance des TEP de juillet à septembre, leur volume total est élevé. Il y a donc une évolution de la taille des TEP des petites vers les plus grandes suggérant des processus d'agrégation durant l'été. La période estivale est caractérisée par un épuisement en sels nutritifs en surface favorisant la production d'exopolymères par le phytoplancton (Obernosterer & Herndl 1995). Cette période coïncide avec une augmentation de la contribution relative des flagellés et du picoplancton (cyanobactéries et prochlorophytes), communauté phytoplanctonique possédant de faibles taux d'exportation (Figure II-8 ; Marty *et al.* 2002). L'accumulation de TEP durant cette période est probablement contrôlée par la coagulation des produits photosynthétiques extracellulaires exsudés par ces organismes sédimentant peu et dont le métabolisme est basé sur la production de régénération. De plus, la forte stratification thermique de la colonne d'eau en cette période agit telle une barrière empêchant le flux vertical de matière. La stratification d'un système modifie la dynamique des particules, augmentant le nombre des grandes particules et accélérant leur coagulation (Jackson 1990) ; la dynamique des TEP à DYFAMED suit ce raisonnement.

Comme pour le pool de carbone organique dissous (COD), considéré comme fraîchement formé et labile, le temps de résidence des TEP doit dépendre de leur dégradation ou non par les bactéries. En plus des conditions limitantes en azote régnant dans les eaux de surface, le phosphore est également un facteur limitant en mer Méditerranée (Coste *et al.* 1988, Béthoux *et al.* 1998). Cette limitation est particulièrement importante durant la période oligotrophique caractérisée par un rapport N/P toujours supérieur à 20 dans les eaux de surface à DYFAMED (Figure II-10 ; Marty *et al.* 2002).

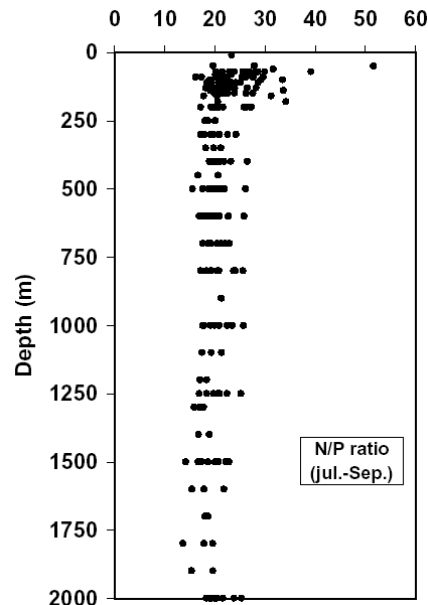


Figure II-10 : Rapports nitrates/phosphates à DYFAMED de 0 à 2000 m de profondeur. Ensemble des valeurs de juillet à septembre 1999. Graphique issu de Marty *et al.* (2002).

En Méditerranée, l'accumulation de matériel organique dégradable en surface durant l'été est expliquée par un « mauvais fonctionnement » du réseau trophique microbien, caractérisé par une dégradation restreinte du COD due à une limitation en phosphore, couplée à un contrôle par les prédateurs (Thingstad & Rassoulzadegan 1995, Thingstad *et al.* 1997). Des expériences d'enrichissement en surface, en Méditerranée Nord-Occidentale (Sala *et al.* 2002, Van Wambeke *et al.* 2002a) et au Point B (Zweifel *et al.* 1993, Thingstad *et al.* 1999, Hagström *et al.* 2001) ont montré que la communauté bactérienne est effectivement limitée en phosphore durant la période stratifiée en zone euphotique. En milieu de culture, en condition de limitation en P, le phytoplancton exsude des hydrates de carbone monomériques et polymériques qui ne sont pas consommés efficacement par les bactéries hétérotrophes (Obernosterer & Herndl 1995). La faible production bactérienne en 1999 à DYFAMED en surface durant la période stratifiée (de 0,05 à 0,10 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$), comparativement à celle observée en mars et en juin (de 0,15 à 0,30 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$; Lemée *et al.* 2002), serait expliquée

par une telle limitation en phosphore. Ainsi, dans ces conditions, les bactéries hétérotrophes ne sont pas capables de solubiliser les TEP, ce qui peut expliquer en partie pourquoi ce pool de matière s'accumule en surface en été.

c) Quel est le devenir du pool de TEP ?

A partir d'octobre, la diminution des températures, associée à de forts vents, entraîne le mélange des eaux de surface, induisant la fin de la période de stratification. Ces conditions hydrologiques favorisent le transport de carbone organique dissous vers les eaux profondes, par diffusion et sédimentation (Avril 2002). Les faibles abondances de TEP observées durant cette période peuvent être attribuées à ces processus. Bien que le flux de particules (en termes de masse de matière et de masse de carbone) observé à DYFAMED à 200 m soit faible en automne (Miquel & La Rosa 1999), leur teneur en carbone par rapport à l'azote est maximale avec un rapport C/N élevé. En effet à DYFAMED, le rapport C/N de la matière organique particulaire collectée à 200 m dans des trappes à sédiments en octobre 1999 était de 10,7 (J.C Miquel, comm. personnelle). Sachant que les TEP sont riches en carbone et que la matière organique particulaire a un rapport C/N proche de celui de Redfield (égal à 6,6), alors ce surplus de carbone organique observé en profondeur pourrait être attribué en partie à la présence des TEP. Ceci suggère que les TEP jouent un rôle dans les flux verticaux de matière en Méditerranée Nord-Occidentale.

4. Conclusion

➡ En Méditerranée nord-occidentale, les particules exopolymériques transparentes sont présentes en forte abondance durant l'année entière (de 2×10^4 à $2,2 \times 10^5$ TEP ml^{-1}). Le pool de TEP fait partie intégrante des milieux oligotrophes ; il est donc à prendre en considération dans l'étude des cycles biogéochimiques de ces systèmes.

➡ La dynamique des TEP n'est pas fondamentalement différente entre le site côtier et le site océanique bien que l'hydrologie plus complexe au site côtier modifie leur distribution saisonnière en favorisant les processus d'agrégaions et de désagrégaions. Cependant ces différences n'affectent pas la distribution de taille globale des TEP. Il semble que la dynamique des TEP reflète davantage le statut trophique de l'écosystème plutôt que des

différences régionales. Globalement, on observe une augmentation du pool de TEP à partir du printemps et une persistance de ce pool durant la période estivale.

➡ La formation et le devenir des TEP dépendent principalement de la communauté phytoplanctonique dominante, des conditions trophiques et de l'hydrologie du milieu.

A DYFAMED, à la fin de l'hiver, tandis que la colonne d'eau n'est pas stratifiée, la formation de TEP liée à une efflorescence de grandes cellules algales (diatomées), semble participer au flux vertical de matière. En juin, la seconde floraison, dominée par des nanoflagellés est également à l'origine de la formation des TEP. Cependant, la forte stratification de la colonne d'eau, accompagnée d'une limitation en phosphore induisant un mauvais fonctionnement du réseau trophique microbien, entraînent l'accumulation des TEP dans la zone de surface en été. Ensuite le mélange hivernal de la colonne d'eau participe au flux vertical de TEP induisant une diminution de ce pool en surface.

Chapitre III

Rôle des TEP dans la surconsommation de carbone inorganique dissous par le phytoplancton.

Impact sur le flux de carbone

A. Introduction	65
B. Matériels & Méthodes	68
1. Estimation du rapport C/N des TEP	68
a) Principe.....	68
b) Protocole expérimental.....	70
c) Echantillonnage et filtration	70
d) Mesure du rapport C/N des TEP	71
2. Estimation des différents pools de carbone organique : TEP, COD, et COP	72
C. Résultats	74
1. Rapport C/N des TEP	74
2. Contribution des TEP au pool de carbone organique	75
D. Discussion	78
1. Formation des TEP par la méthode de bullage.....	78
2. Contribution des TEP au stock de carbone organique.....	79
3. Rôle des TEP dans la surconsommation de carbone par le phytoplancton.....	81
4. Conclusion	84

A. INTRODUCTION

La matière organique dissoute (MOD) des écosystèmes aquatiques représente l'un des plus grands réservoirs de carbone de la biosphère (Hedges 1987, Farrington 1992). Elle est produite en grande partie par l'exsudation passive ou active du phytoplancton et peut représenter jusqu'à 58% du carbone photo-synthétisé (Baines & Pace 1991, Biddanda & Benner 1997, Nagata 2000). Dans la partie ouest de la Méditerranée, en zone oligotrophique, la production extracellulaire peut représenter jusqu'à 23,5% de la production primaire nette totale à la profondeur du maximum de chlorophylle *a* (Fernández *et al.* 1994). Il a été montré en Méditerranée Nord-Occidentale (Copin-Montégut & Avril 1993) et en mer des Sargasses (Carlson *et al.* 1994), que le pool de MOD s'accumulait dans la zone euphotique depuis la floraison printanière jusqu'à la fin de l'été. L'accumulation d'un tel pool de MOD riche en carbone, coïncide avec une période où l'azote est fortement limitant et implique un rapport C/N d'assimilation par le phytoplancton de l'ordre de 14. Un tel rapport d'assimilation a été observé durant les floraisons printanières (Sambrotto *et al.* 1993, Sambrotto & Langdon 1994) et durant l'été (Williams 1995, Marchal *et al.* 1996, Copin-Montégut 2000), en mesurant les variations concomitantes des concentrations du carbone inorganique dissous (CID) et du nitrate en surface. Ainsi, l'assimilation par le phytoplancton du CID par rapport à celui des nitrates, dépasserait considérablement le rapport C/N de 106/16 (soit 6,6), caractéristique de la composition spécifique des organismes marins (Redfield *et al.* 1963). L'utilisation du rapport C/N de Redfield pour convertir la production nouvelle (basée sur les nitrates) en carbone, sous-estimerait donc la production nette de carbone organique de plus de 50% (Sambrotto *et al.* 1993). Ce processus a été défini comme étant une « surconsommation apparente de carbone par le phytoplancton » (Toggweiler 1993).

L'une des hypothèses émise à ce sujet suggère que la matière organique libérée durant la photosynthèse ne combine pas le carbone et l'azote dans les proportions moléculaires décrites par le rapport de Redfield (Toggweiler 1993, Copin-Montégut 2000). En effet, puisque la biomasse phytoplanctonique présente un rapport C/N égal à 6,63 (106/16), il est supposé que le surplus de carbone organique serait émis via la production extracellulaire. Ceci implique la formation d'un pool de matière organique riche en carbone circulant dans le système avec un rapport C/N anormalement élevé (Figure III-1).

Récemment, Kepkay *et al.* (1997) ont montré que la matière organique colloïdale (MOC), produite lors des floraisons printanières, présentait effectivement un rapport C/N

élevé, supérieur à 13. Il a aussi suggéré que la source principale de ce pool de matière serait l'assemblage d'exopolymères (tels que les polysaccharides) exsudés par le phytoplancton et les bactéries. Dans l'eau de mer, ces exopolymères sont capables de s'aligner et se lier par l'intermédiaire de ponts cationiques pour former les TEP (Alldredge *et al.* 1993). Puisque ces particules sont formées par coagulation de ces exopolymères riches en carbone (Mari & Burd 1998), elles devraient donc présenter un rapport C/N élevé en particulier en période oligotrophe. Ainsi, le pool de matière organique circulant dans les océans avec un rapport C/N élevé, formé consécutivement à la photo-assimilation du CID en surface, serait représenté par l'ensemble des particules exopolymériques transparentes (TEP). L'objectif principal de cette étude est de tester cette hypothèse. La surconsommation apparente de CID par le phytoplancton a été observée notamment en Méditerranée Nord-Occidentale au site DYFAMED (Copin-Montégut 2000). Cette zone s'avère donc un site privilégié quant à l'étude du rôle des TEP dans le cycle du carbone en milieu pélagique.

Nous nous attacherons donc à répondre aux problématiques suivantes :

- quelle est l'évolution saisonnière du rapport C/N des TEP ?
- quelle est la contribution des TEP au pool de carbone organique dans la zone euphotique?
- la formation des TEP pourrait-elle s'expliquer par la surconsommation apparente de carbone inorganique dissous par le phytoplancton, observée dans cette zone en période oligotrophe ?
- la formation abiotique des particules exopolymériques à partir de matière organique dissoute serait-elle une nouvelle voie de transfert du carbone dans le système pélagique ?

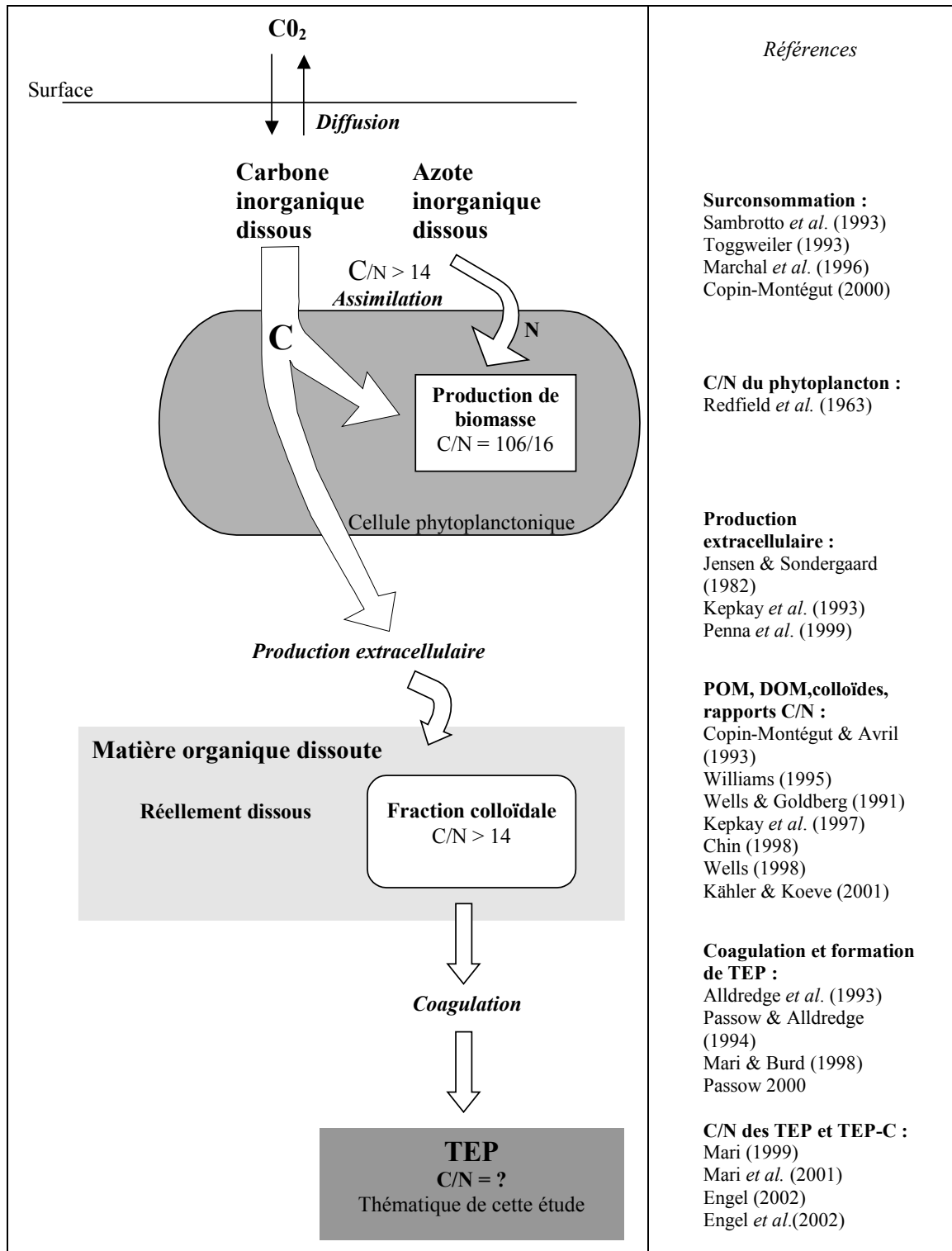


Figure III-1 : Représentation schématique de la problématique de cette étude, à savoir : quel est le rôle des TEP dans la surconsommation de CID par le phytoplancton ? A droite, sont indiquées quelques références bibliographiques traitant des différents processus impliqués. (Cette liste n'est pas exhaustive).

B. MATERIELS & METHODES

1. Estimation du rapport C/N des TEP

Il est difficile expérimentalement de séparer les TEP des autres particules en suspension. En effet, ce pool de matière organique est composé de matériel fragile capable d'adsorber les éléments en suspension dans la colonne d'eau tels des détritiques, des cellules algales, des organismes vivants et morts (Dam & Drapeau 1995). Afin de mesurer le rapport C/N des TEP, il est nécessaire de les isoler. Ce problème est résolu en produisant des TEP par la méthode de bullage (Johnson *et al.* 1986, Zhou *et al.* 1998, Mari 1999) à partir d'une fraction filtrée d'eau de mer naturelle.

a) Principe

La méthode pour former des agrégats par le phénomène de « coagulation de surface » décrit par Johnson *et al.* (1986) a été utilisée dans cette étude pour produire des TEP. Il s'agit de la coagulation de matière organique dissoute et colloïdale à l'interface air-eau de bulles produites en laboratoire. Une bulle injectée dans l'eau par l'intermédiaire d'un bulleur en verre fritté se déplace vers la surface en créant une interface mobile entre les phases liquides et gazeuses. Au cours de son déplacement, la bulle collecte à sa surface de la matière colloïdale qui s'accumule dans la partie inférieure de celle-ci, créant ainsi un agrégat d'origine colloïdale (Figure III-2 haut).

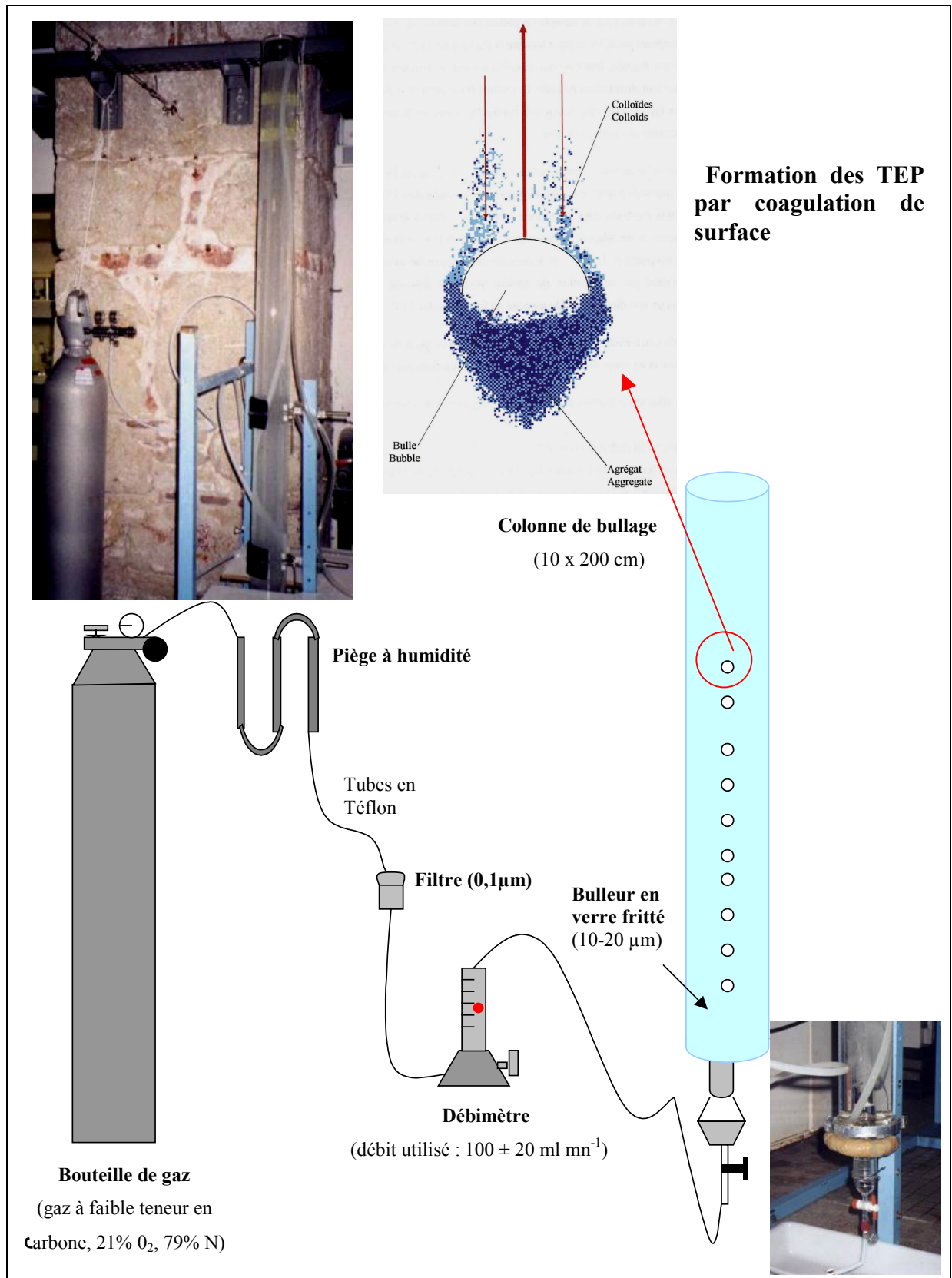


Figure III-2 : Formation d'agrégats par le processus de coagulation de surface (schéma haut) et protocole utilisé lors de la méthode de bullage. Schémas inspirés de Mari (1997).

b) Protocole expérimental

L'eau de mer naturelle est issue du Point B et du site DYFAMED. Elle a été prélevée mensuellement de février 1999 à février 2000, à la profondeur du maximum de chlorophylle *a* (chapitre II). A l'issue des missions en mer, 20 litres d'eau prélevés au moyen d'une bouteille Niskin, sont filtrés sur GF/C Whatman™ (1,2 µm de porosité, 125 mm de diamètre), sous une pression d'aspiration constante et basse (< 150 mbar). De cette façon, en plus de la matière organique dissoute et colloïdale nécessaires à la formation des TEP, seuls les virus, les bactéries et quelques petites cellules phytoplanctoniques passent au travers du filtre. Une filtration sur 0,45 µm ne permet pas la formation de TEP (Mopper *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1998). Le filtrat ainsi obtenu est versé dans une colonne de verre borosilicatée de 10 x 200 cm (Figure III-2 bas). Des bulles sont produites au fond de la colonne au moyen d'un bulleur en verre fritté de 10 à 20 µm de porosité (Johnson *et al.* 1986). Un gaz à faible teneur en carbone ($\text{CO} + \text{CO}_2 < 1 \text{ ppm}$; $\text{H}_2\text{O} < 5 \text{ ppm}$) composé d'un mélange d'oxygène (21%) et d'azote (79%), est utilisé pour générer les bulles avec un débit de $100 \pm 20 \text{ ml mn}^{-1}$ (Kepkay 1991). Le gaz passe successivement par un piège contenant un tamis moléculaire (Hewlett-Packard™, maille de $5 \times 10^{-4} \text{ µm}$) destiné à retenir les impuretés organiques ainsi que l'humidité, par un filtre de 0,1 µm de porosité (Millipak 200, Millipore™) et enfin par un débitmètre, avant de traverser le verre fritté. Les tubes conduisant le gaz de la bouteille au bulleur sont en téflon.

c) Echantillonnage et filtration

Au bout de 1, 3 et 5 h de bullage, un échantillon d'eau est prélevé au centre de la colonne. Une fraction est destinée à la détermination de l'abondance, de la concentration volumique et de la distribution de taille des TEP formées dans la colonne, selon la méthode du Filter-Transfer-Freeze (protocole décrit au chapitre I). Une autre fraction est destinée à la mesure du carbone et de l'azote particuliers. A cette fin, une série de 5 aliquots de volumes croissants est filtrée sur GF/F Whatman™ (0,7 µm de porosité, 25 mm de diamètre). Les filtres sont préalablement brûlés à 550°C durant 2h. Lors de la mise au point de ce protocole, nous avons testé la sensibilité de l'analyseur CHN (Leco 900™) en fonction du volume filtré. Au vu des résultats, il apparaît que la filtration d'une succession de volumes de 100, 200, 300, 400 et 500 ml offre la meilleure qualité de réponse.

Les spectres de taille des TEP issues de la colonne sont similaires aux spectres de taille des TEP prélevées en milieu naturel (Figure III-3). Ceci confirme l'efficacité de cette

méthode pour produire des TEP à partir d'eau de mer naturelle filtrée sur GF/C. L'ensemble des distributions est présenté en annexe B.

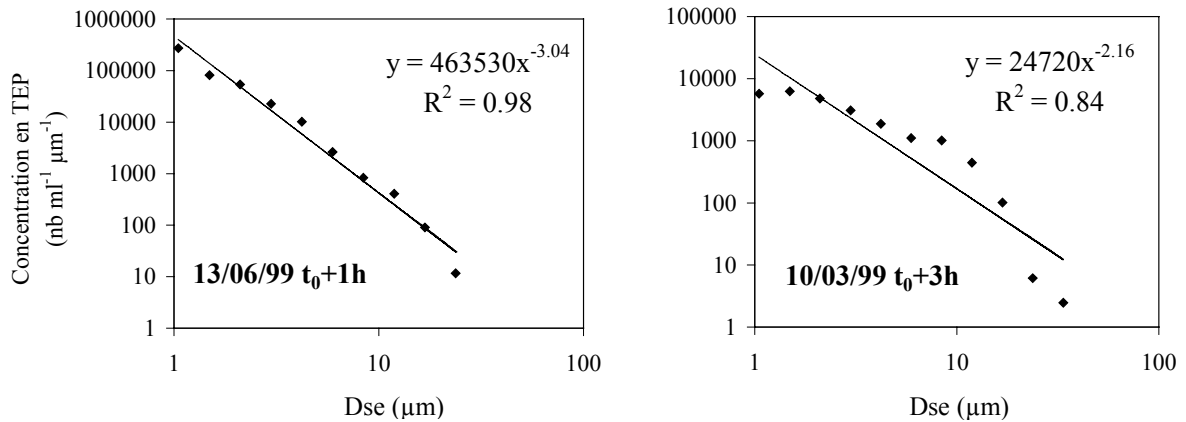


Figure III-3 : Exemples de spectres de taille des TEP échantillonnés dans la colonne après 1h et 3h de bullage. Gauche : eau de mer issue de DYFAMED, Droite : eau de mer issue du Point B.

d) Mesure du rapport C/N des TEP

Le rapport C/N des TEP dans la colonne, est calculé à partir des pentes des droites de régression décrivant d'une part, la quantité de carbone (COP ; μgC par filtre), d'autre part la quantité d'azote (NOP ; μgN par filtre) en fonction des volumes filtrés (ml) (Søndergaard & Middleboe 1993). Le rapport C/N des TEP sera donné en moyenne ± erreur standard.

Contribution des bactéries hétérotrophes à l'apport de carbone et d'azote

Les bactéries hétérotrophes issues du milieu naturel sont présentes dans la colonne de bullage. Leur contribution en carbone et en azote à la mesure du COP et du NOP a donc été estimée. L'abondance bactérienne est déterminée avant la filtration sur GF/C, puis lors de chaque expérience de bullage (au bout de 1, 3h et 5h). Un aliquot de 10 ml est filtré sur un filtre polycarbonate noir de 0,2 μm de porosité après marquage par 0,25 μg ml⁻¹ de 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) selon la méthode de Porter et Feig (1980). Trois réplicats sont effectués à chaque prélèvement. Pour chaque échantillon, un minimum de 200 à 300 bactéries est compté au grossissement x1000 sous un microscope à épifluorescence. La fraction des bactéries retenues sur les filtres GF/F est estimée à partir du comptage dans la colonne de bullage et dans le filtrat après filtration sur GF/F. Connaissant l'abondance bactérienne et supposant un contenu en carbone de 12,4 fg par cellule et un rapport C/N de 6,4 (Fukuda *et al.* 1998), on en déduit l'apport en carbone et en azote organiques par les

bactéries. A DYFAMED, la biomasse bactérienne représente de 0,6 à 9,8% du COP mesuré ($3,3 \pm 2,9\%$; moyenne \pm écart-type ; $n = 164$) et de 0,6 à 21,2 % ($3,4 \pm 2,7\%$; $n = 157$) au Point B . Le rapport C/N des TEP a donc été calculé en termes de COP/NOP après correction liée au carbone et à l'azote bactériens. Bien que d'autres organismes compris entre 0,7 et 1,2 μm peuvent être présents dans la colonne de bullage, nous n'avons détecté que des cellules apparaissant comme étant des bactéries hétérotrophes.

2. Estimation des différents pools de carbone organique : TEP, COD, et COP

Les TEP sont des agrégats de nature fractale (Mari 1999). Ainsi leur porosité augmente avec leur taille, induisant une réduction de la masse par unité de volume, quand la taille des particules augmente. Dans cette étude, le contenu en carbone des TEP (en $\mu\text{gC ml}^{-1}$) a été déterminé à partir de leur distribution de taille *in situ* en utilisant la relation établie par Mari (1999) :

$$\text{TEP-C} = 0,25 \sum_i n_i r_i^{2,55} \quad (8)$$

où n_i est la concentration en particules dans la classe de taille i et r_i est le rayon (μm) des TEP dans cette même classe de taille. La concentration en carbone organique lié aux TEP sera donnée en moyenne \pm erreur standard.

Avant de prédire la concentration en TEP-C *in situ*, nous avons testé la validité de l'équation (8) au laboratoire, dans la colonne de bullage. La comparaison entre le TEP-C prédit par l'équation et la concentration en carbone des TEP, mesurée à partir des données du CHN, montre que le $\text{COP}_{\text{mesuré}} = 0,87 \times \text{COP}_{\text{prédit}} + 0,01$ ($R^2 = 0,75$; $n = 18$) lorsqu'il s'agit d'eau échantillonnée à DYFAMED. Concernant les prélèvements du Point B, on obtient : $\text{COP}_{\text{mesuré}} = 0,79 \times \text{COP}_{\text{prédit}} + 0,07$; $R^2 = 0,17$; $n = 8$). Nous utiliserons donc cette formule de conversion afin d'estimer la concentration en carbone lié aux TEP *in situ*.

Le pool de carbone organique lié aux TEP (TEP-C) a été comparé aux autres réservoirs de carbone organique tels que le carbone organique dissous (COD), particulaire (COP), total (COT) et le carbone lié au phytoplancton (C-phyto).

Les données de carbone organique dissous sont issues des travaux d'Avril (2002). Cet auteur a établi un cycle annuel du COD à DYFAMED, basé sur 40 profils mensuels. Nous disposons également des données de 1999 mais uniquement de septembre à décembre

(Lemée *et al.* 2002). Les valeurs de COD étant conservatives, nous avons donc utilisé les données issues des travaux d'Avril (2002), correspondant à la profondeur du maximum de chlorophylle *a* (DCM). Les valeurs de carbone organique particulaire (COP) sont issues de la base de données JGOFS-France. Elles proviennent des mêmes échantillonnages que les TEP (même jour, même profondeur). Les concentrations en COP ont été déterminées par oxydation à haute température au moyen de l'analyseur « Heroes CHN-O-Rapid analyzer™ » (Miquel *et al.* 1994). Le carbone organique total (COT) a été estimé en additionnant le COD et le COP. La part de carbone organique lié au phytoplancton (C-phyto) a été déterminée en opposant les données de COP ($\mu\text{g l}^{-1}$) aux données de chlorophylle *a* (mg m^{-3} ; Marty *et al.* 2002). La relation entre le COP et la chlorophylle *a* à DYFAMED est décrite par une régression linéaire ($y = 44,7x + 36,2$; $R^2 = 0,7$; $\text{ddl} = 7$; $p < 0,05$), estimée également à partir des données de 1999 à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*. La pente de la droite de régression révèle un rapport C/Chlo *a* de 45. Nous utiliserons donc ce rapport pour estimer la contribution du phytoplancton en termes de carbone (C-phyto). La production primaire (PP) a été déterminée par l'incorporation *in situ* de bicarbonate marqué au ^{14}C (Dandonneau & Le Bouteiller 1992). Le facteur de correction décrit par Moutin *et al.* (1999) a été utilisé pour convertir les taux de production primaire obtenus sur 4h d'incubation en taux journaliers (24h). Les données de production primaire ($\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$) sont issues de la profondeur du maximum de chlorophylle *a* comme les TEP.

Les données de COP, de COD, de chlorophylle *a* et de production primaire, à DYFAMED sont disponibles sur la base de données JGOFS-France, accessible via le site <http://www.obs-vlfr.fr/jgoifs/html/bdjgoifs.html>. Elles n'ont pas fait l'objet de mesures lors de ce travail de thèse.

C. RESULTATS

1. Rapport C/N des TEP

D'une façon générale, le rapport molaire C/N des TEP est élevé comparativement au rapport C/N théorique de Redfield (Figure III-4). Les rapports C/N des TEP à DYFAMED et au Point B ont globalement la même distribution saisonnière. Ils augmentent à partir de juin et restent élevés durant la période stratifiée. Au site océanique, ce rapport varie de $6,0 \pm 0,5$ en octobre, à $72,8 \pm 17,4$ en juillet. Au site côtier, il varie de $5,6 \pm 0,2$ en mai, à $80,5 \pm 7,2$ en juillet. Durant la période stratifiée (de juin à septembre), le rapport C/N moyen des TEP est de $37,7 \pm 13,8$ à DYFAMED et de $36,3 \pm 18,2$ au Point B. Pendant le reste de l'année, il est respectivement de $12,5 \pm 1,9$ et de $11,4 \pm 1,8$ au site océanique et au site côtier. Le rapport C/N de la matière organique particulaire totale (MOP) à DYFAMED varie de 6,2 à 14,3. Il est globalement inférieur à celui des TEP.

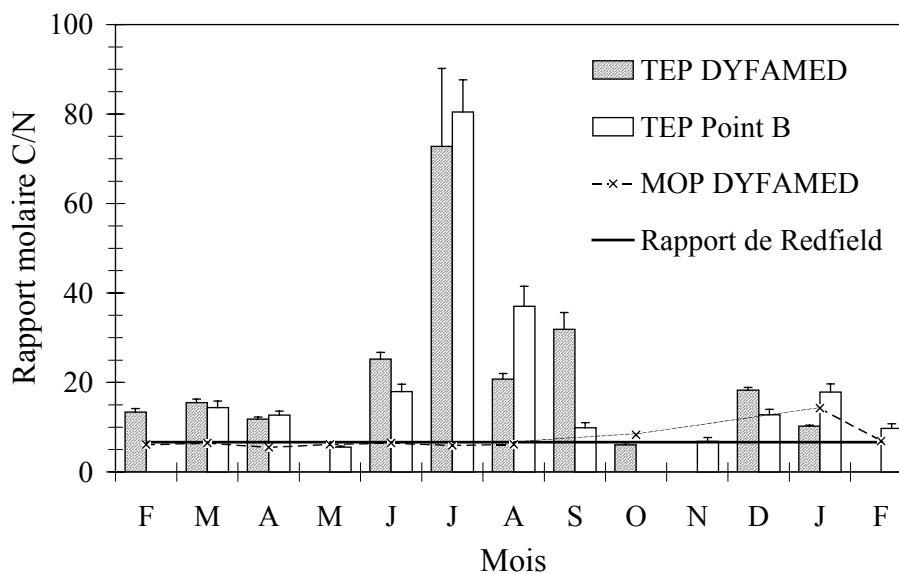


Figure III-4 : Variations saisonnières du rapport molaire C/N des TEP à DYFAMED (barres grises) et au Point B (barres blanches) de février 1999 à février 2000 à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*. Le rapport molaire C/N de la matière organique particulaire à DYFAMED est également représenté (ligne discontinue). La ligne noire horizontale illustre le rapport C/N théorique de Redfield (106/16).

2. Contribution des TEP au pool de carbone organique

Le stock de carbone organique représenté par les TEP (TEP-C) varie de 0,6 à 20,5 $\mu\text{mol C l}^{-1}$ à DYFAMED et de 2,0 à 13,1 $\mu\text{mol C l}^{-1}$ au Point B (Figure III-5). Au site océanique, de février à avril, les concentrations en TEP-C sont relativement faibles avec des valeurs inférieures à 4 $\mu\text{mol C l}^{-1}$, puis elles augmentent et restent élevées jusqu'en septembre. Durant la période stratifiée, le pool de carbone lié aux TEP représente $12,0 \pm 3,4 \mu\text{mol C l}^{-1}$ tandis qu'il est égal à $2,4 \pm 0,6 \mu\text{mol C l}^{-1}$ le reste de l'année. L'accumulation du pool de carbone lié au TEP durant l'été coïncide avec la période de limitation en azote.

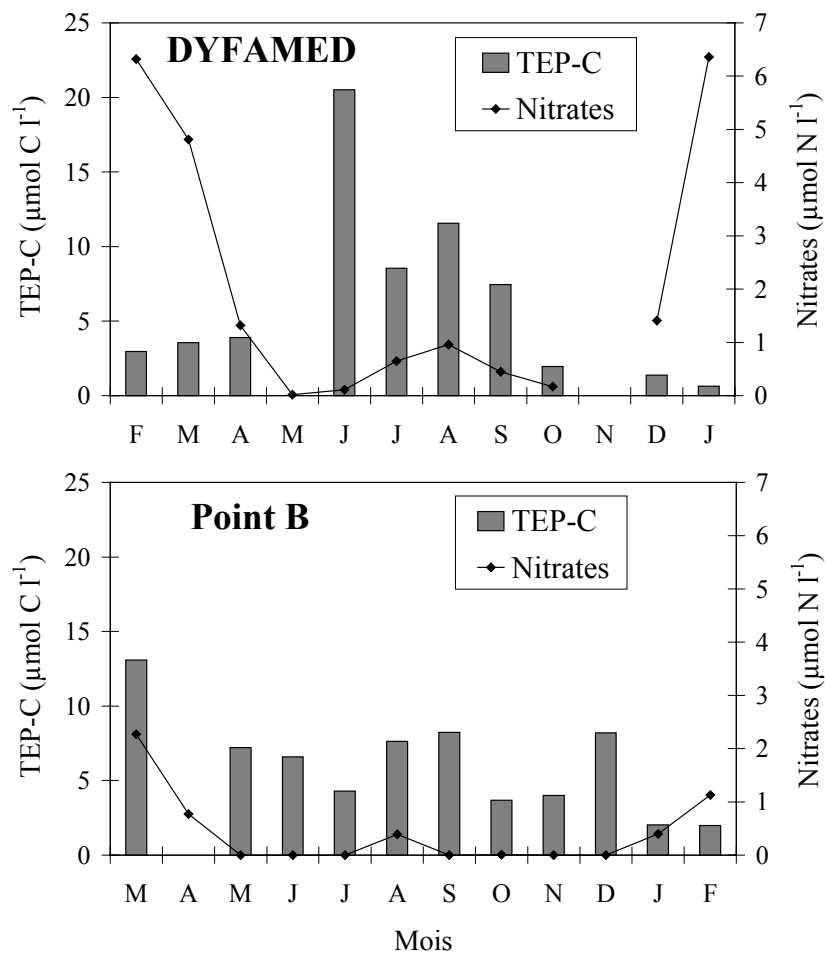


Figure III-5 : Variations saisonnières de la concentration en carbone lié aux TEP (TEP-C en $\mu\text{mol C l}^{-1}$; barres grises) et des nitrates (en $\mu\text{mol N l}^{-1}$; trait noir) à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*. La figure du haut correspond aux données de DYFAMED de février 1999 à janvier 2000, la figure du bas correspond aux données du Point B de mars 1999 à février 2000.

Au Point B, la contribution des TEP en termes de carbone organique est maximale en mars, période relativement riche en nitrates, coïncidant avec la floraison printanière. Durant la période stratifiée, la concentration en TEP-C est de l'ordre de $6,7 \pm 1,0 \mu\text{mol C l}^{-1}$, le reste de l'année elle est égale à $5,7 \pm 1,6$. On n'observe pas d'accumulation de carbone lié au TEP en été (Figure III-5).

A DYFAMED, le taux de production primaire (PP) suit globalement la même distribution saisonnière que celle des nitrates (Figure III-6). Ainsi, en juin, après la seconde efflorescence, la PP diminue fortement pour atteindre des valeurs de $0,18 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ tandis que la concentration en carbone lié aux TEP est maximale. La production primaire reste relativement basse durant l'été. Inversement, de décembre à mai, lorsque la production primaire est élevée ($0,33 \pm 0,05 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$), le pool de TEP-C est relativement faible.

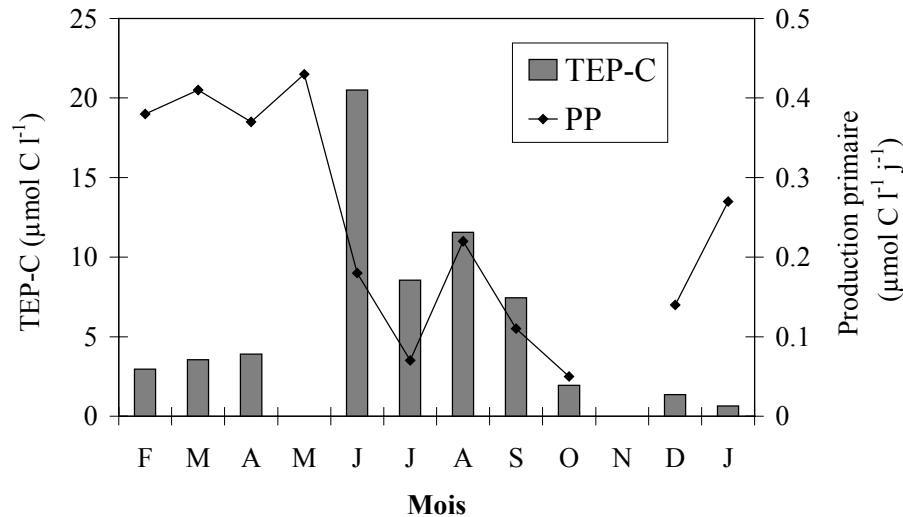


Figure III-6 : Variations saisonnières de la concentration en carbone lié aux TEP (TEP-C en $\mu\text{mol C l}^{-1}$; barres grises) et de la production primaire ($\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ j}^{-1}$; trait noir) à DYFAMED, à la profondeur du maximum de chlorophylle *a*, de février 1999 à janvier 2000. Les valeurs de production primaire sont issues de la base de données DYFAMED-JGOFS-France.

Nous avons comparé le pool de TEP en termes de carbone aux autres réservoirs de carbone organique (Tableau III-I). La concentration en matière organique particulaire à DYFAMED varie de 3,7 (février) à $10,4 \mu\text{mol C l}^{-1}$ (juin). La concentration en carbone organique dissous représente de 77 à $84 \mu\text{mol C l}^{-1}$. A DYFAMED, les TEP contribuent pour 15% du réservoir de carbone organique total (COT) en moyenne, durant la période stratifiée et pour 3% le reste de l'année. Au Point B, elles représentent de 2% du COT en hiver à 15% du COT durant la floraison de mars. Les estimations du pool de TEP-C sont souvent supérieures aux concentrations de carbone organique particulaire (COP) et à celles du carbone apporté par

les cellules algales (C-phyto). Bien que les valeurs de TEP-C semblent être sur-estimées, ces résultats montrent que les TEP représentent un réservoir important de carbone organique en Méditerranée Nord-Occidentale.

Tableau III-I : Concentrations en carbone organique particulaire (COP), en carbone organique dissous (COD), en carbone organique lié au phytoplancton (C-phyto) et en carbone organique des TEP (TEP-C), à DYFAMED et au Point B, de février 1999 à février 2000. La concentration en TEP-C a été comparée à celle en carbone organique total (TEP-C/COT). L'ensemble des données est issu de la profondeur du maximum de chlorophylle *a* afin de permettre les comparaisons.

	COP	COD	C-Phyto	C-Phyto	TEP-C	TEP-C	TEP-C/ COT	
Unités	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	$\mu\text{mol C l}^{-1}$	%	%
Lieux	DYF.	DYF.	DYF.	Point B	DYF.	Point B	DYF.	Point B
Références	JGOFS	Avril (2002)	Cette étude	Cette étude	Cette étude	Cette étude	Cette étude	Cette étude
Mois								
Fév.	3,7	77,5	3,2	-	2,9	-	4	-
Mar.	7,5	78,5	5,4	1,9	3,5	13,1	4	15
Avr.	7,4	84,0	3,2	2,2	3,9	-	4	-
Mai	4,8	83,0	2,1	2,4	-	7,2	-	8
Juin	10,4	81,0	7,2	0,8	20,5	6,6	22	7
Juil.	7,4	81,5	5,1	2,2	8,5	4,3	10	5
Août	4,9	75,0	1,0	2,1	11,6	7,6	14	10
Sept.	-	70,0	1,8	1,3	7,4	8,2	-	-
Oct.	5,9	70,0	1,3	1,0	1,9	3,7	3	5
Nov.	-	82,0	-	0,7	-	4,0	-	2
Déc.	-	82,0	1,2	1,1	1,4	8,2	-	2
Jan.	6,3	77,5	2,1	1,4	0,6	2,0	1	2
Fév.	7,1	78,5	-	2,0	-	2,0	-	2

D. DISCUSSION

1. Formation des TEP par la méthode de bullage

La méthode de bullage permet d'accélérer les processus de formation des TEP à partir de leur précurseurs (MOD et colloïdes) par des mécanismes de coagulation de surface (Zhou *et al.* 1998). Bien que le mode de formation soit différent de celui des TEP issues du milieu naturel (où différents processus de coagulation entrent en jeu, comme les mouvements browniens, la différence de vitesse de sédimentation, ou le cisaillement dû à la turbulence), il semble que les caractéristiques des TEP produites en laboratoire reflètent bien celles des TEP trouvées dans le milieu naturel. En effet, les TEP issues de la colonne de bullage présentent des spectres de taille similaires à ceux des TEP « naturelles ». L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'isoler les TEP des autres particules en suspension en vue d'analyses ultérieures. La formation abiotique de TEP à partir de leurs précurseurs a été également mise en évidence de façon efficace, en chambres d'incubation (« couette chamber » ou « couette flocculator ») via des processus de cisaillements laminaires et turbulents (Passow 2000, Engel & Passow 2001), cependant ces systèmes nécessitent de travailler avec des petits volumes (moins de 2 litres).

La méthode de bullage a déjà été utilisée pour estimer le rapport C/N des TEP en fonction des conditions trophiques, à partir de cultures de phytoplancton (Mari 1999). Cependant les résultats ont révélé une composition élémentaire des TEP constante ($C/N \sim 7$) même en conditions limitantes en azote. Il a été supposé que ces résultats étaient un artefact lié à l'adsorption de composés azotés dissous, originaires du milieu de culture, après formation des TEP. En effet, celles-ci agissent telles des éponges (« scavengers » ; Wells & Goldberg 1991, Niven *et al.* 1997) en particulier pour des composés azotés organiques ou inorganiques, tels que les acides aminés, les protéines ou les nitrates (Schuster *et al.* 1998), entraînant la formation de TEP riches en azote. Afin de se soustraire à ce problème lié au milieu de culture, nous avons établi un protocole expérimental basé sur la formation des TEP à partir d'eau de mer naturelle. Celles-ci sont ainsi exemptes de tout composé autre que les constituants naturels de l'eau de mer. Cette méthode nous permet d'estimer leur rapport C/N sans artefacts liés aux phénomènes d'adsorption secondaire.

2. Contribution des TEP au stock de carbone organique

Aux deux sites les TEP représentent jusqu'à 15% du carbone organique total. Leur implication dans le cycle biogéochimique du carbone dans les océans est donc importante. Les estimations du pool de carbone dû aux TEP (TEP-C) sont souvent élevées comparativement aux autres sources de carbone organique, notamment durant la période de stratification à DYFAMED. Par exemple, les TEP représenteraient 183% du carbone organique particulaire (en considérant une concentration moyenne de $13,5 \pm 6 \mu\text{M-C}$ durant les trois mois d'été). Il est improbable que les concentrations en TEP-C (définies méthodologiquement comme appartenant à la matière organique particulaire) excèdent les concentrations de COP. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette incohérence :

1) Le pool de TEP-C est estimé à partir de la distribution de taille des TEP à DYFAMED et au Point B, en se basant sur une équation calibrée à partir de TEP produites en laboratoire, par coagulation d'exsudats de diatomées (Mari 1999). Or cette communauté phytoplanctonique synthétise de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires (Mykkestad 1974, Alldredge & Gotschalk 1989). Ces conditions expérimentales en milieu enrichi et contrôlé sont éloignées des conditions naturelles en Méditerranée nord-occidentale où l'oligotrophie prédomine et où la communauté algale à l'origine de la formation des TEP n'est évidemment pas mono-spécifique. De plus, d'après Engel & Passow (2001) la relation entre carbone et TEP est spécifique à chaque groupe phytoplanctonique. Les termes d'une telle relation pourraient donc surestimer le pool de carbone lié aux TEP dans notre étude. En effet, des calculs basés sur les mesures de TEP dans la colonne de bullage, montrent que l'équation théorique surestime respectivement de 13% et de 21% le TEP-C mesuré à partir du COP, à DYFAMED et au Point B. Cela pourrait expliquer, au moins en partie, pourquoi, *in situ*, les valeurs de TEP-C sont si élevées comparativement aux valeurs de COP mesurées. A l'avenir, les termes de l'équation convertissant les TEP en pool de carbone organique sont à affiner afin d'être en adéquation avec les conditions naturelles. A l'heure actuelle, cette relation est la seule disponible.

2) Les valeurs de COP seraient sous-estimées, car elles n'incluent pas la totalité des TEP. Traditionnellement, la mesure du COP est basée sur la fraction de matière organique retenue sur des filtres GF/F de porosité moyenne de $0,7 \mu\text{m}$. Or, les TEP étant flexibles et fragiles, elles sont capables de se déformer et de traverser les pores de tels filtres. En effet, plus de 50% des TEP sont perdues après filtration sur $0,6 \mu\text{m}$ au lieu de $0,2 \mu\text{m}$ (Passow & Alldredge 1995b). Ces auteurs ont également mis en exergue la nécessité d'utiliser de faibles

pressions de filtration pour l'étude des TEP. Supposons que les TEP inférieures à 3 μm soient perdues lors de la filtration et calculons leur apport en termes de carbone organique : au site DYFAMED, les TEP inférieures à 3 μm contribuent pour 5% (en avril 99) et pour 68% (en octobre 99) au stock total de carbone organique dû aux TEP. Au Point B, le carbone apporté par les petites TEP représente de 2% (en mai 99) à 27% (en juillet 99). La fraction des petites TEP, probablement perdues lors des mesures du COP, n'est donc pas négligeable.

Les concentrations en TEP-C observées dans cette étude, sont cependant cohérentes avec celles estimées en différents sites par Engel & Passow (2001). Ces auteurs ont révélé des concentrations en carbone lié aux TEP de 11,7 μM en un site côtier du Pacifique, de 14,1 μM en Mer Baltique, de 3,3 μM en Atlantique Nord-Est, et de 64,1 μM en Mer Adriatique Nord (représentant 103% du COP). Ces auteurs suggèrent qu'une fraction des TEP est en réalité mesurée en tant que carbone organique dissous, car les filtres GF/F ne peuvent retenir l'ensemble de ces particules.

Les TEP sont arbitrairement définies comme appartenant à la fraction particulaire de la matière organique puisqu'elles sont déterminées après filtration sur 0,2 μm . Cependant, elles sont formées majoritairement par la coagulation de matière organique dissoute de haut poids moléculaire tels que les colloïdes (Johnson *et al.* 1986, Chin *et al.* 1998, Passow 2000). Or la phase colloïdale est très dynamique, impliquant de forts taux d'agrégation (Wells 1998). A l'inverse, les grandes particules (dont les TEP) peuvent être une source de particules sub-micrométriques via des processus de désagrégation (Koike *et al.* 1990). Il existe un état d'équilibre dynamique entre les colloïdes et la fraction particulaire, et les cinétiques d'assemblage sont concentration-dépendantes (Chin *et al.* 1998). Ainsi, règnent des échanges continuels entre les pools de matière organique dissoute et particulaire qui sont étroitement liés. En conséquence, la classification dichotomique de la matière organique opposant le dissous du particulaire selon des critères opérationnels est problématique lorsque l'on étudie les pools très dynamiques de MOD de haut poids moléculaire et les TEP (Kirchman *et al.* 1991, Mari & Burd 1998). Les TEP appartiennent en réalité à un continuum de matière et devraient donc être redéfinies comme étant des **Produits Exopolymériques Transparents**. Etant donné les contraintes techniques, ce réservoir de matière organique ne peut être étudié qu'en termes de matière organique particulaire. Cependant au vu de nos résultats, les TEP en tant que particules, ne représentent que la face émergée de l'iceberg.

3. Rôle des TEP dans la surconsommation de carbone par le phytoplancton

Le carbone atmosphérique (CO_2) pénètre par diffusion dans les océans sous forme dissoute. Une part de ce carbone est recyclée directement dans la zone euphotique par les producteurs primaires, lors de la photosynthèse (processus nommé « pompe biologique »). Une autre part est re-minéralisée en sub-surface ou plus profondément. Afin de prédire le taux d'exportation de carbone vers les profondeurs, la quantité de carbone inorganique dissous (CID) convertie en carbone organique lors de la photosynthèse, doit être connue. En référence au modèle stoechiométrique de Redfield, il a été montré que la quantité de CID extraite en surface excédait significativement les quantités attendues (Sambrotto *et al.* 1993, Toggweiler 1993, Marchal *et al.* 1996). Cette surconsommation apparente de CID comparativement à la consommation d'azote inorganique dissous (nitrate, azote gazeux, ammonium, nitrite), durant les floraisons printanières et durant la période estivale, a suscité différentes hypothèses.

La première suggère un recyclage préférentiel de l'azote durant la décomposition microbienne du matériel détritique (Sambrotto *et al.* 1993) impliquant ainsi la sédimentation de résidus riches en carbone vers les couches profondes. Toutefois, des mesures simultanées de carbone et d'azote organique dans la matière particulaire ne montrent pas systématiquement un fort rapport C/N, dans ou sous la couche euphotique (Copin-Montégut 2000). De plus l'activité microbienne est limitée en période oligotrophique, en particulier à DYFAMED, comme on l'a évoqué au chapitre précédent.

Selon la deuxième hypothèse, toutes les formes inorganiques de l'azote n'ont pas été prises en considération (Marchal *et al.* 1996, Copin-Montégut 2000) : la fixation d'azote atmosphérique (N_2) par certaines espèces phytoplanctoniques permet la formation de matière organique sans consommation de nitrates. A DYFAMED par exemple, les cyanobactéries, organismes diazotrophiques, sont particulièrement abondantes au début et à la fin de la période stratifiée (Marty *et al.* 2002). Cependant, Marchal *et al.* (1996) ont montré que ce phénomène pouvait expliquer seulement 1% de la surconsommation de CID.

Enfin, une dernière hypothèse suggère qu'il y a réellement surconsommation de CID par rapport à l'azote. En conséquence, la matière organique libérée durant la photosynthèse ne combine pas le C et le N dans les proportions moléculaires décrites par le rapport de Redfield, ce qui implique la présence d'un large pool de matériel organique circulant dans les océans possédant un rapport C/N anormalement élevé (Toggweiler 1993). Cet auteur prédit que ce pool de MO devrait atteindre de 15 à 50 $\mu\text{mol C l}^{-1}$ dans la zone euphotique, après la floraison

printanière. Or le pool de TEP, à DYFAMED, augmente de $16,61 \mu\text{mol C l}^{-1}$ d'avril à juin 1999 et reste élevé en conditions appauvries en azote. De plus, leur rapport C/N est élevé tout au long de l'année avec des maxima durant la période de stratification, aux deux sites. Ces résultats, d'une part, valident l'hypothèse de la surconsommation de CID évoquée initialement par Toggweiler (1993) et d'autre part, montrent que les TEP représentent le produit final de cette surconsommation : la photo-assimilation des cellules phytoplanctoniques alors que l'azote est limitant, entraîne une forte production de carbone organique.

Ce scénario implique que la production primaire n'est pas limitée à la production de biomasse mais inclut aussi les produits extracellulaires tels que la matière organique dissoute riche en carbone et les TEP. Durant la période stratifiée, les faibles concentrations en nitrates et en phosphates limitent la production de biomasse, mais l'assimilation de carbone par le phytoplancton persiste. Le surplus de carbone est exsudé via les substances polysaccharidiques extracellulaires qui sont ensuite acheminées vers le pool de TEP par des processus de coagulation (Figure III-6). Bien que la production primaire soit relativement faible en été, le taux d'assimilation de carbone par unité de chlorophylle *a* (P^B) est maximal durant cette période, en particulier en août et septembre 1999, en surface, à DYFAMED (5-7 $\text{gC g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$; Marty & Chiavérini 2002 ; Figure III-7).

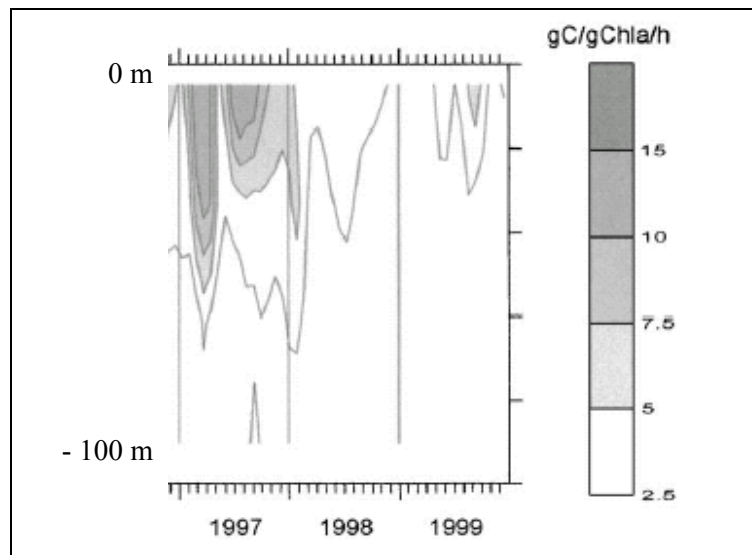


Figure III-7 : Taux d'assimilation du carbone par unité de chlorophylle *a* (en $\text{gC [g Chl } a]^{-1} \text{ h}^{-1}$) sur les 100 premiers mètres de la colonne d'eau à DYFAMED de 1997 à 1999. Graphique issu de Marty & Chiavérini (2002).

Une part de cette assimilation est attribuée aux cyanobactéries, présentes en forte abondance durant cette période. Même si leur forte activité est liée en partie à leur capacité à assimiler l'azote atmosphérique, les forts taux d'assimilation observés impliquent la production de matériel organique qui ne combine pas le C, le N et le P dans les proportions moléculaires décrites par Redfield.

Finalement, si l'on considère un système théorique clos, sans perte (par respiration) et sans apport, alors le carbone assimilé lors de la production primaire, est égal au carbone utilisé pour la production de biomasse, ajouté au carbone exsudé par la production extracellulaire (Figure III-8). D'avril à juin à DYFAMED, la concentration en chlorophylle *a* augmente de $1,07 \mu\text{g l}^{-1}$. Supposant un rapport C/Chlo *a* de 45, la production de biomasse phytoplanctonique est de $4,01 \mu\text{mol C l}^{-1}$. Durant cette même période, il y a formation de $16,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ de TEP-C. Selon notre équation théorique, $20,61 \mu\text{mol C l}^{-1}$ ont été assimilés lors de la production primaire. Or les variations de nitrates durant cette période sont de $1,21 \mu\text{mol N l}^{-1}$, impliquant un rapport C/N d'assimilation de 17. Bien que ces valeurs soient théoriques, ce rapport d'assimilation est cohérent avec les valeurs observées dans différents systèmes (Sambrotto *et al.* 1993, Copin-Montégut 2000) et confirme le rôle des TEP dans la surconsommation de CID par le phytoplancton.

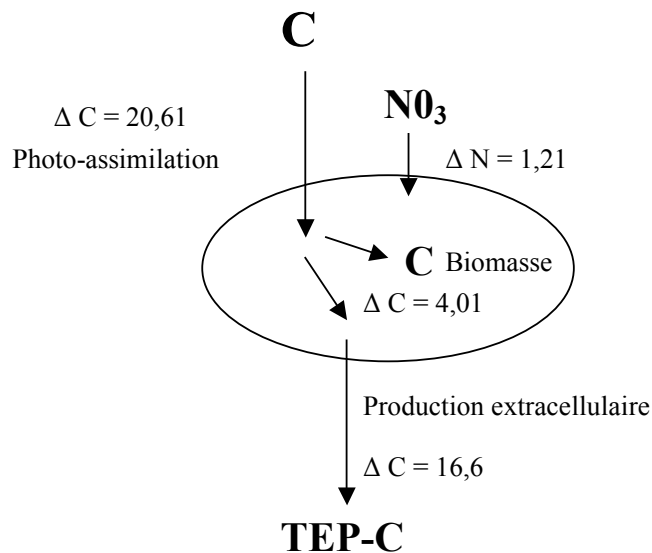


Figure III-8 : Schéma conceptuel illustrant la surconsommation de CID par rapport à l'azote par le phytoplancton, d'avril à juin à DYFAMED. Les résultats impliquent un rapport C/N d'assimilation de 17. Selon ce modèle, 80% du C assimilé est relâché dans le milieu et acheminé vers le réservoir de TEP.

4. Conclusion

Cette étude est la première à estimer le rapport C/N des TEP issues du milieu naturel. Sachant que les TEP sont principalement composées de polysaccharides, il était attendu que ce rapport soit supérieur à 106/16. Cependant, celui-ci est variable, il est maximal durant la période oligotrophique et ce, aux deux sites étudiés. On note également une accumulation du pool de carbone lié aux TEP durant l'été, en particulier au site océanique, coïncidant avec la période de limitation en azote et de faible production primaire.

➡ Ces résultats impliquent que la production de TEP serait une voie importante de transfert du carbone lors de la surconsommation de carbone inorganique dissous en période oligotrophique. La production primaire n'est donc pas limitée à la production de biomasse mais inclut aussi les produits extracellulaires tels que la matière organique dissoute riche en carbone et les TEP. Les estimations de production primaire basées sur les variations de biomasse, sous-estiment donc l'assimilation de CID par le phytoplancton.

De plus, les mesures de carbone organique particulaire, telles qu'elles sont réalisées traditionnellement en milieu aquatique, sous-estiment une fraction du stock de TEP. Leur rôle dans le cycle biogéochimique du carbone a donc été négligé jusqu'à présent. Pourtant, elles représentent jusqu'à 15% du carbone organique total.

➡ Les TEP appartiennent à un continuum de matière organique et devraient donc être redéfinies comme étant des *Produits Exopolymériques Transparents*.

Chapitre IV
Effet des conditions trophiques et de la turbulence sur la
dynamique des Particules Exopolymériques
Transparentes
Etude en mésocosmes

A. Introduction	87
B. Matériels & Méthodes	91
1. <i>Protocole expérimental</i>	91
2. <i>Mise en évidence et comptages des TEP</i>	93
3. <i>Mesures du carbone et de l'azote organiques particulières</i>	93
4. <i>Production de TEP</i>	94
5. <i>Bactéries agrégées aux TEP</i>	94
a) Préparation des échantillons	94
b) Observation et énumération des bactéries liées aux TEP	94
c) Bactéries agrégées en fonction de la taille des TEP	96
6. <i>Autres paramètres</i>	97
C. Résultats	98
1. <i>Nutriments et biomasse phytoplanctonique</i>	98
a) Conditions initiales	98
b) Mésocosmes non enrichis en sels nutritifs (T0 à T4)	98
c) Mésocosmes enrichis (NT0 à NT4)	100
2. <i>Dynamique des TEP</i>	101
3. <i>Dynamiques du carbone et de l'azote</i>	103
4. <i>Effet de la turbulence sur la dynamique des TEP</i>	106
a) Effet de la turbulence sur la production et la sédimentation des TEP	106
b) Effet de la turbulence sur la distribution de taille des TEP	108
5. <i>Impact de la turbulence sur les relations TEP/bactéries</i>	111
D. Discussion	116
1. <i>Source des TEP</i>	116
2. <i>Facteurs influençant la formation des TEP</i>	117
a) Influence des conditions trophiques	117
b) Influence de la turbulence	118
3. <i>Dynamiques du carbone et de l'azote</i>	118
4. <i>Effet de la turbulence sur l'agrégation et la sédimentation des TEP</i>	120
5. <i>Colonisation bactérienne des TEP</i>	123
a) Colonisation en fonction de la taille des TEP	123
b) Rôle des TEP en tant que micro-niche	123
c) Effet des conditions trophiques et de la turbulence sur la colonisation bactérienne	124
6. <i>Conclusion</i>	125

A. INTRODUCTION

La mer du Nord connaît des problèmes d'eutrophisation débutant dans les années 1950 avec un fort accroissement dans les années 1980 (Radach 1992 cité par Pätsch & Radach 1997). Les eaux côtières sont fortement enrichies en nutriments apportés par les fleuves tels que l'Escaut, le Rhin, l'Ems, le Weser et l'Elbe. Cet apport a contribué à l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des floraisons de *Pheaeocystis sp.* depuis les années 1980 entraînant comme en mer Adriatique la formation de grands mucilages (Lancelot 1995). Le projet européen NTAP (Nutrient dynamics mediated through Turbulence And Plankton interactions) a pour objectif de comprendre comment la charge en nutriments et en matière organique, associée à un hydrodynamisme élevé caractéristique des zones côtières, peut influencer les problèmes d'eutrophisation. Nos travaux de recherches concernant l'effet de la turbulence et des conditions trophiques sur la dynamique des particules exopolymériques transparentes, s'inscrivent dans le cadre de ce programme européen.

Dans les systèmes naturels, les processus physico-chimiques et biologiques contrôlant la dynamique des TEP sont étroitement liés et interagissent constamment. De plus, en milieu naturel, les contraintes liées à l'éloignement des sites d'étude et au coût relativement élevé des missions en mer, ne permettent pas un échantillonnage fréquent. L'ensemble de ces caractéristiques ne facilite pas l'étude de processus rapides telle que la formation des TEP. Nous avons donc effectué des expériences en milieu contrôlé, afin de comprendre comment les conditions trophiques, associées à différentes intensités de turbulence, peuvent contrôler la dynamique des particules exopolymériques transparentes.

L'étude du contrôle exercé par la turbulence à petite échelle, sur les écosystèmes aquatiques, montre que celle-ci peut modifier de façon drastique la structuration du réseau trophique pélagique (Margalef 1978, Peters & Marrasé 2000, Maar *et al.* 2002). L'échelle d'espace à laquelle les forces de frottements visqueux équilibrent les forces inertielles est appelée échelle de Kolmogorov (η en unité de longueur). Elle représente le diamètre moyen du plus petit tourbillon, susceptible d'exister au sein d'un écoulement turbulent (Encadré 1). Elle est fonction de la viscosité du fluide et de l'intensité de turbulence. Plus l'intensité est forte et plus la turbulence concernera des organismes petits. Aux échelles inférieures à l'échelle de Kolmogorov, les structures tourbillonnaires disparaissent sous l'effet du frottement visqueux. Ainsi, en théorie, une particule (vivante ou non) de taille inférieure à

l'échelle de Kolmogorov se trouve dans un environnement visqueux et ne devrait pas être influencée par la turbulence. La Figure IV-1 illustre ce processus. Par exemple, une bactérie de taille de l'ordre du micromètre est inférieure à l'échelle de Kolmogorov et vivra dans un environnement totalement visqueux, où la turbulence n'a plus d'effet, à moins d'accroître de façon irréaliste son intensité. Il en est de même pour les virus et le picoplancton. Cependant, ces considérations théoriques deviennent de plus en plus controversées et il semble que la turbulence peut affecter des particules de taille inférieure à l'échelle de Kolmogorov (Hill *et al.* 1992). Les protozoaires par exemple, tels que les ciliés et les flagellés voient leur comportement (taux d'ingestion) affecté par la turbulence (Peters & Marassé 2000, Dolan *et al.* 2003). L'énergie cinétique de turbulence permet également d'augmenter les taux de rencontre entre particules de taille supérieure à quelques μm (Mc Cave 1984, Kepkay 1994) pouvant alors induire leur coagulation. De plus en plus de travaux confirment donc l'influence de la turbulence sur des organismes de taille inférieure à l'échelle de Kolmogorov.

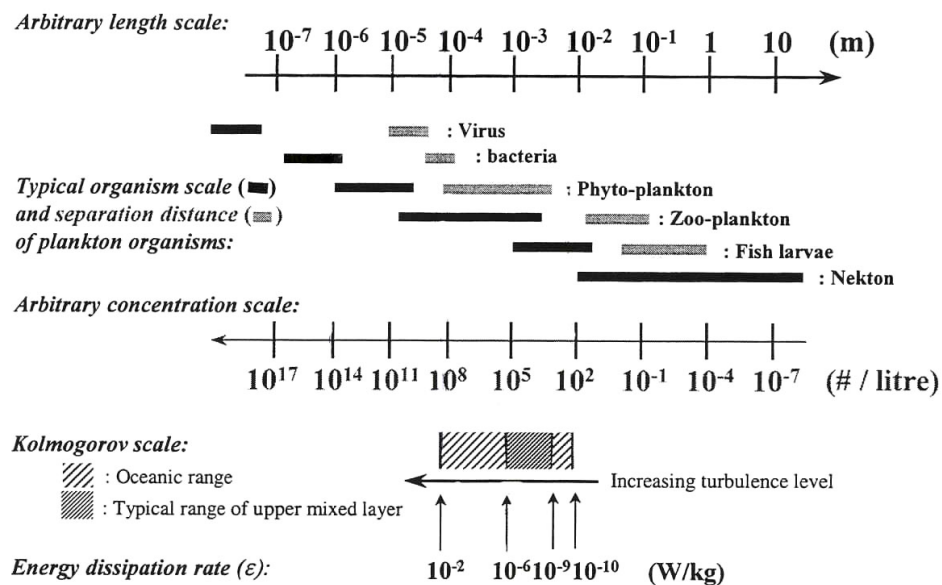


Figure IV-1 : Gammes de tailles typiques d'organismes appartenant à différents niveaux trophiques (barres noires), associées à leurs concentrations observées dans le milieu naturel (barres grises). Au bas de la figure est illustrée l'échelle de Kolmogorov typique des océans (la zone ombrée est représentative de la couche mélangée de surface). L'échelle de Kolmogorov diminue lorsque l'intensité de turbulence augmente. Les flèches indiquent les taux d'énergie dissipative correspondant aux échelles de Kolmogorov. Schéma issu de Stiansen (2001).

Les particules exopolymériques transparentes se situent dans une gamme de taille de l'ordre de 10⁻⁶ à 10⁻⁴ m. Selon le schéma théorique de la Figure IV-1, seules les plus grandes particules (> 100 μm) pourraient être influencées par des intensités de turbulence très élevées

(du type courant tidaux, fronts). Cependant, étant données les controverses évoquées précédemment, et compte tenu du faible nombre de travaux expérimentaux concernant l'effet de la turbulence sur les particules organiques et en particulier sur les TEP, il est intéressant d'étudier l'éventuel impact de l'énergie cinétique de turbulence sur la dynamique de ces particules.

Le principal mode de formation des TEP est la coagulation de matière organique colloïdale via des phénomènes de collisions (Mari & Burd 1998). Ceux-ci sont induits par les mouvements browniens, la différence de vitesse de sédimentation et la turbulence. La coagulation dépend notamment de la concentration en particules et du coefficient d'adhésion. Or, d'une part, les TEP sont très abondantes dans le milieu naturel et d'autre part, elles possèdent un coefficient d'adhésion élevé, comparativement aux autres particules marines (Dam & Drapeau 1995, Engel 2000). Au chapitre II, nous avons montré que la concentration en TEP est dépendante du statut trophique du milieu. Ainsi, la turbulence pourrait avoir un effet sur le spectre de taille des TEP, et cet effet pourrait être fonction des conditions trophiques.

Enfin, les particules exopolymériques transparentes constituent un site privilégié pour la colonisation bactérienne (Alldredge *et al.* 1993, Mari & Kiørboe 1996, Carrias *et al.* 2002). Puisque la turbulence favorise les taux de rencontre entre prédateurs et proies à micro-échelle (Rostchild & Osborn 1988), il est possible qu'elle favorise également les taux de rencontre entre bactéries et TEP.

Les principaux objectifs de ce chapitre sont donc de déterminer si l'énergie cinétique de turbulence peut affecter la dynamique des TEP. Si tel est le cas, l'effet de la turbulence dépend-il des conditions trophiques du milieu ?

Nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- Comment les conditions trophiques gouvernent la formation des TEP ?
- La turbulence a-t-elle un effet sur la production des TEP par le phytoplancton ?
- Quel est le rôle des TEP dans la dynamique du carbone, associée à une efflorescence phytoplanctonique en mésocosme ?
- La turbulence peut-elle entraîner l'agrégation ou la désagrégation des TEP ?
- La turbulence influence-t-elle le flux vertical de matière lié aux TEP ?
- La turbulence a-t-elle un effet sur la colonisation bactérienne des TEP ?

Encadré 1 : Qu'est-ce que la turbulence ?

Le processus de turbulence est créé par l'injection d'une quantité d'énergie cinétique à la masse d'un fluide. La turbulence n'est pas la propriété d'un fluide, mais décrit son état de mouvement (Gargett 1997). L'état turbulent d'un écoulement se caractérise par des fluctuations aléatoires des vitesses instantanées et des directions de mouvement de chaque parcelle du fluide, se matérialisant sous forme de tourbillons. Gargett (1997) a caractérisé les flux turbulents comme suit :

- La turbulence est un phénomène de **seuil** : sous un certain seuil de vitesse, le flux devient laminaire et non plus turbulent. Ce seuil est décrit par le nombre de Reynolds qui est fonction de l'échelle spatiale considérée, de la vitesse du flux et de la viscosité du milieu.
- Le mouvement turbulent est **aléatoire** : la direction et la vitesse instantanée du flux turbulent ne sont pas prédictibles et sont généralement caractérisées par des valeurs moyennes (figure ia).
- À petite échelle, la turbulence est **tri-dimensionnelle** et tend à être **isotropique** (égale en toute direction).
- La turbulence est **dissipative** (figure ib) : Dans un espace à trois dimensions, les plus grands tourbillons générés par une source d'énergie deviennent instables et se brisent formant des tourbillons plus petits et plus nombreux qui évoluent de la même manière en un processus nommé « **cascade de l'énergie cinétique turbulente** » (Richardson 1922). Aux plus petites échelles du mouvement turbulent, l'énergie cinétique est finalement dissipée sous forme de chaleur par les forces de frottement visqueux. Ce processus de dissipation de l'énergie cinétique se développe jusqu'à la plus petite échelle d'espace du mouvement turbulent, l'échelle de Kolmogorov (η).

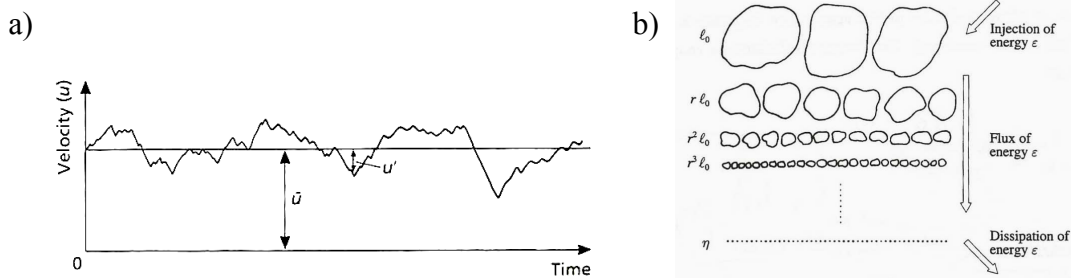


Figure i : a) Enregistrement théorique de la vitesse d'un fluide soumis à un flux turbulent illustrant la différence entre la valeur moyenne et la composante u' fluctuante (Schéma issu de Mann & Lazier 1991). b) Schéma illustrant la cascade de l'énergie cinétique turbulente selon la théorie de Kolmogorov (1941) (Schéma issu de Stiansen (2001)).

À petite échelle, l'intensité de turbulence est uniquement déterminée par le taux de dissipation de l'énergie (Kolmogorov 1941), ainsi l'intensité de turbulence est exprimée en termes de taux d'énergie dissipative ϵ (en $\text{cm}^2 \text{s}^{-3}$ ou en W kg^{-1}).

Sources de turbulence dans les océans :

Les sources d'énergie cinétique turbulente dans les océans sont multiples. Elles sont généralement divisées en deux catégories : les mécanismes engendrant la turbulence de façon indirecte et ceux la générant de façon directe. Les principaux apports d'énergie dans les océans entraînant la création indirecte de la turbulence sont les vagues, le stress lié au vent, les refroidissements de surface, les forces tidales, les frictions liées à la couche limite et les gradients de densité instables (verticaux et horizontaux). Les principales sources directes de turbulence sont les mouvements de cisaillement, la convection, les instabilités de Kelvin-Helmholtz (dues aux vagues internes), le déferlement des vagues et les processus de diffusion double (Svendsen 1997).

B. MATERIELS & METHODES

1. Protocole expérimental

L'étude a été réalisée en mésocosmes de polyéthylène de 2 m de diamètre et de 3 m de profondeur soit environ 9 m³ (Planche IV-1). Ils sont remplis d'eau de mer naturelle filtrée sur 250 µm afin de retirer les plus gros organismes et les macro-détritus. Les mésocosmes sont placés en extérieur et sont donc soumis aux conditions naturelles de luminosité, de température et de pluviométrie.

La turbulence est générée par des grilles horizontales placées à 1 m de profondeur, oscillant verticalement sur 40 cm. Les grilles sont faites de plexiglassTM et ont un diamètre de 1,5 m. Les intensités de turbulence sont générées par l'application de différentes fréquences de mouvement des grilles. Un doppler acoustique est utilisé pour mesurer l'énergie cinétique de turbulence dont est déduit le taux d'énergie dissipative (m² s⁻³ ou W kg⁻¹).

La plupart des expériences en laboratoire traitant de l'influence de la turbulence sur le plancton, sont effectuées avec des intensités de turbulence largement supérieures à celles observées dans la nature (Peters & Redondo 1997). Durant cette étude, les intensités choisies sont proches des conditions naturelles. Quatre intensités de turbulence sont appliquées dans différents mésocosmes, à savoir : $1\cdot 3\cdot 10^{-7}$, $5\cdot 8\cdot 10^{-6}$, $1\cdot 10^{-5}$ et $1\cdot 10^{-4}$ cm² s⁻³. Un cinquième traitement ne contient pas de système générant la turbulence. Une série de mésocosmes (5 au total) est soumise à un apport initial en sels nutritifs (jour 1) selon les concentrations 16 µM NO₃²⁻, 1µM PO₄³⁻, 32 µM Si (N/P/Si = 16/1/32 ; rapport de Redfield). Une seconde série ne fait pas l'objet d'un enrichissement. Au total, 10 traitements sont étudiés : avec ou sans addition de sels nutritifs, et selon 5 niveaux de turbulence différents (Tableau IV-I).

Les échantillonnages sont effectués au moyen d'un tube de plexiglass, au centre de chaque mésocosme à 1 m de profondeur. L'expérience a duré 14 jours avec une fréquence d'échantillonnage de 2 jours.



Prélèvement dans
les mésocosmes

Système générant la turbulence

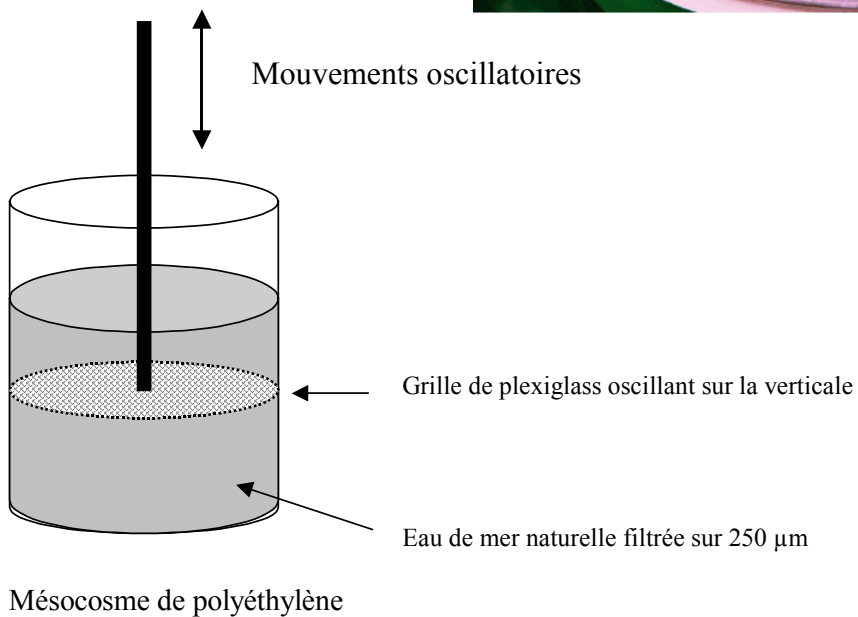



Planche IV-1 : Photographies du protocole expérimental : prélèvement (haut) et système générant la turbulence (milieu). Schématisation d'un mésocosme (bas).

Tableau IV-I : Récapitulatif des intensités de turbulence appliquées, équivalence en milieu naturel et nomenclature utilisée dans ce manuscrit.

Intensités de turbulence mesurées (cm ² s ⁻³)		Equivalence en milieu naturelle en zone de surface	Nomenclature	
			Sans sels nutritifs	Avec sels nutritifs (N)
 (+)	2×10^{-9}	Aucune turbulence	T0	NT0
	$1-3 \times 10^{-7}$	Zone stratifiée de la colonne d'eau, temps calme	T1	NT1
	$5-8 \times 10^{-6}$	Léger vent	T2	NT2
	1×10^{-5}	Forte Tempête Fort vent	T3	NT3
	1×10^{-4}	Très forte tempête / Chenal de marée/Zone côtière	T4	NT4

2. Mise en évidence et comptages des TEP

La méthode de mise en évidence des TEP (« Lames Blanches Dépolies »), ainsi que les observations et les comptages sont décrits au chapitre I. Concernant les mésocosmes non enrichis, seuls ceux soumis aux niveaux de turbulence 0, 2 et 4 ont fait l'objet d'analyses (T0, T2 et T4). L'ensemble des mésocosmes enrichis (NT0, NT1, NT2, NT3 et NT4) a été étudié.

3. Mesures du carbone et de l'azote organiques particuliers

Le carbone et l'azote organiques particuliers (COP et NOP) ont été analysés à partir d'une série d'échantillons de volumes croissants (100, 300 et 500 ml) filtrés sur GF/F (0,7 µm de porosité moyenne, fibre de verre) préalablement brûlés à 500°C. Les filtres sont ensuite séchés pendant plus de 12h à 60°C dans une étuve. Les concentrations en COP et en NOP sont ensuite déterminées par analyse au CHN (Leco 900™).

L'apport en carbone organique par les TEP (µgC ml⁻¹) a été estimé selon l'équation (9), basée sur le spectre de taille des TEP :

$$\text{TEP-C} = 0,25 \sum_i n_i r_i^D \quad (9)$$

où n_i est la concentration en particules dans la classe de taille i , r_i est le diamètre de sphère équivalente dans cette même classe de taille et D est la dimension fractale des particules établie comme étant égale à 2,55 (Mari 1999).

4. Production de TEP

Pour estimer la production de TEP dans les mésocosmes, on supposera dans un premier temps que les TEP ne sont pas perdues par sédimentation, broutage ou dégradation bactérienne. De cette façon, la variation journalière des TEP normalisée par la biomasse phytoplanctonique ($\mu\text{g Chl l}^{-1}$) peut nous donner une indication quant à la production de TEP dans les différents mésocosmes (Prieto *et al.* 2002). La variation journalière sera estimée selon $\text{TEP}_{t+1} - \text{TEP}_t / \Delta t$.

5. Bactéries agrégées aux TEP

a) Préparation des échantillons

Les bactéries liées aux TEP ont été dénombrées après double coloration au DAPI (4' 6'-diamidino-2-phénylindole) et au bleu Alcian (Passow & Alldredge 1994). La première étape consiste à marquer les bactéries au DAPI selon la méthode de Porter & Feig (1980). Les échantillons ainsi marqués sont ensuite filtrés selon le protocole habituel de mise en évidence des TEP. Un volume de 5 ml ou 10 ml est filtré sur 0,2 μm sous une faible pression de filtration. Puis 500 μl d'une solution de bleu Alcian (0,02% 8GX) sont ajoutés et filtrés. Le filtre est ensuite déposé entre deux gouttes d'huile, entre lame et lamelle. Les lames sont conservées au congélateur jusqu'à l'analyse. Cette expérience a été effectuée du jour 0 au jour 11 dans les mésocosmes T0, T2, T4, NT0, NT2 et NT4.

b) Observation et énumération des bactéries liées aux TEP

Un microscope à épifluorescence couplé à une caméra CCD, reliée à un ordinateur, est utilisé afin de visualiser les lames au moyen d'un logiciel d'analyses d'images (Image Pro+). Le grossissement utilisé est de x630. Deux photographies d'un même champ d'observation sont prises : la première sous lumière UV afin de visualiser les bactéries, la deuxième sous lumière transmise afin de visualiser les TEP. Le traitement des images est réalisé au moyen d'une macro simple permettant une acquisition répétitive et rapide.

Les étapes du traitement des images sont :

1/ L'application d'un filtre Hi-Gauss sur chaque photo (kernel 9x9) afin de réduire le bruit. Ce filtre est appliqué une seule fois sur les photos prises sous lumière transmise, deux fois sur les photos prises sous UV.

2 / Une augmentation des contrastes des images des TEP.

3/ Une superposition simple des deux images permettant une visualisation directe et simultanée des particules et des bactéries (Figure IV-2 ; Figure IV-3).

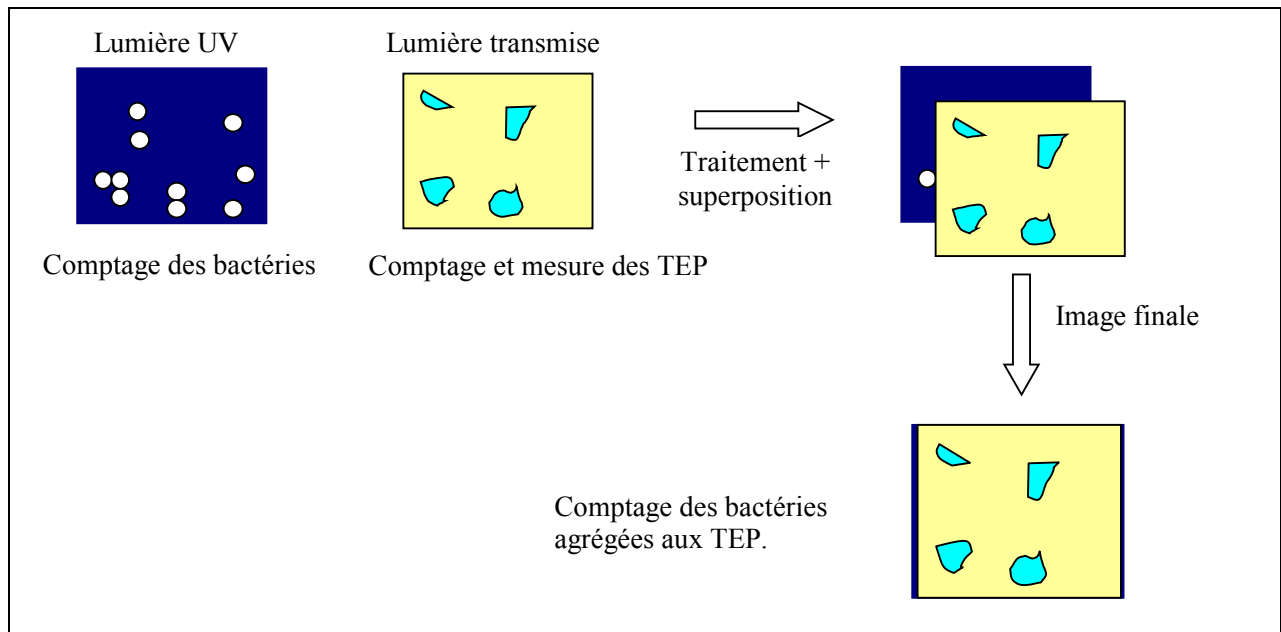


Figure IV-2 : Schéma explicatif du protocole de visualisation simultanée des bactéries et des TEP.

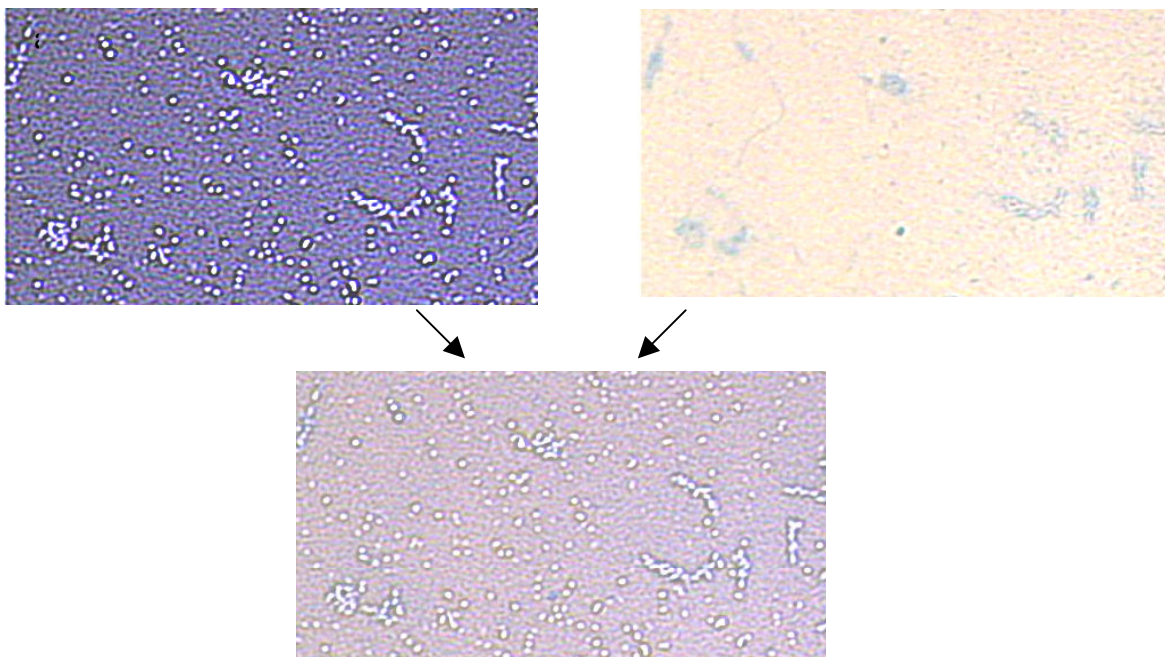


Figure IV-3 : a) Bactéries observées sous lumière UV b) TEP observées sous lumière transmise c) Résultat de la superposition des deux photographies. (Grossissement x630).

Pour chaque lame, un minimum de 500 bactéries est compté et 70 TEP en moyenne sont analysées. Deux réplicats par échantillon sont effectués.

Une fraction de bactéries libres, en suspension, peut se retrouver sur les TEP après filtration et être alors comptée comme bactéries attachées. Cette fraction a été estimée en considérant la surface du filtre, le volume échantillonné, la surface totale représentée par les TEP et la concentration bactérienne. La probabilité pour une bactérie libre de se trouver sur une TEP après filtration est de $2,8\% \pm 1,3\%$ (1-6% ; $n = 51$). Compte tenu des faibles probabilités, la part des bactéries libres comptées comme agrégées sera ignorée. Les résultats seront présentés sous forme pourcentage.

c) Bactéries agrégées en fonction de la taille des TEP

Pour chaque échantillon, la relation entre le nombre de bactéries liées aux TEP et la taille de ces particules a été étudiée. Cette relation est décrite par une loi de puissance du type :

$$n = ad^b \quad (10)$$

où n est le nombre de bactéries attachées aux TEP, d est le diamètre de sphère équivalente (Dse en μm), et a et b sont des constantes caractéristiques d'un échantillon donné (Mari & Kjørboe 1996). Celles-ci sont déterminées à partir des droites de régression décrivant la relation de n versus d .

L'effet des sels nutritifs et de la turbulence sur la colonisation bactérienne, a été testé par une analyse de covariance (ANCOVA) à deux facteurs de contrôle (sels nutritifs (A) / turbulence (B)), pour 2 x 3 échantillons indépendants. La variable dépendante est le nombre de bactéries attachées, la variable concomitante est la taille des TEP (Dse). Cette analyse a été effectuée le jour 0 (conditions initiales) et le jour 11 (dernier prélèvement).

Avant de décrire les résultats de l'ANCOVA nous nous sommes assurés de la normalité des distributions et de l'homogénéité des régressions, conditions nécessaires à l'application d'un tel test. Les calculs ont été effectués via le logiciel VassarStats disponible sur le site <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>.

6. Autres paramètres

Afin de comprendre l'ensemble des processus influençant la dynamique des particules exopolymériques transparentes, un certain nombre de paramètres chimiques et biologiques doivent être connus. Pour cela nous disposons de la base de données liée au projet NTAP, disponible sur le site <http://www.icm.es/bio/projects/ntap/>. Les données concernant les sels nutritifs, la chlorophylle *a*, les diatomées, la production primaire et la production bactérienne sont issues de cette base de données.

C. RESULTATS

1. Nutriments et biomasse phytoplanctonique

a) Conditions initiales

Les conditions trophiques initiales (Jour 0) dans l'ensemble des mésocosmes sont celles de l'eau de mer naturelle prélevée dans le fjord (Raunefjord). Les concentrations en sels nutritifs sont faibles car l'échantillonnage a été effectué en période post-floraison. Les valeurs initiales de nitrates sont de $0,57 \mu\text{M}$, celles de phosphates de $0,23 \mu\text{M}$, enfin celles de silicates sont de l'ordre de $1,47 \mu\text{M}$. Le rapport N/P des sels nutritifs est de 2,5, indiquant une limitation par l'azote pour le phytoplancton. La concentration en chlorophylle *a* est de $1,43 \mu\text{g l}^{-1}$. La communauté phytoplanctonique est dominée par des diatomées avec des espèces typiques de la période estivale des fjords, à savoir *Chaetoceros sp.*, *Cylindrotheca closterium*, *Dactyliosolen fragilissimus* et *Nitzschia longissima* (A. Jacobsen, comm. personnelle).

b) Mésocosmes non enrichis en sels nutritifs (T0 à T4)

Dans les mésocosmes non enrichis, les nitrates sont consommés dès le premier jour (Figure IV-4, gauche) atteignant très vite des concentrations inférieures au seuil de détection, quel que soit le niveau de turbulence. Les concentrations en phosphate diminuent sensiblement avec le temps mais ne sont jamais limitantes pour le phytoplancton (F. Thingstad, comm. personnelle). Elles atteignent des concentrations de l'ordre $0,12$ à $0,16 \mu\text{M}$ en fin d'expérience. La concentration en silicates diminue dans l'ensemble des mésocosmes pour atteindre des valeurs de $0,80 \mu\text{M}$ (T0), $0,22 \mu\text{M}$ (T2) et $0,51 \mu\text{M}$ (T4). Les concentrations en chlorophylle *a* restent faibles durant la totalité de l'expérience dans les mésocosmes non enrichis ne dépassant jamais $1,74 \mu\text{g l}^{-1}$. Elles sont légèrement supérieures dans les mésocosmes soumis à la turbulence. L'espèce phytoplanctonique dominante est *Chaetoceros danicus*, espèce se développant en milieu naturel lorsque les concentrations en sels nutritifs sont faibles.

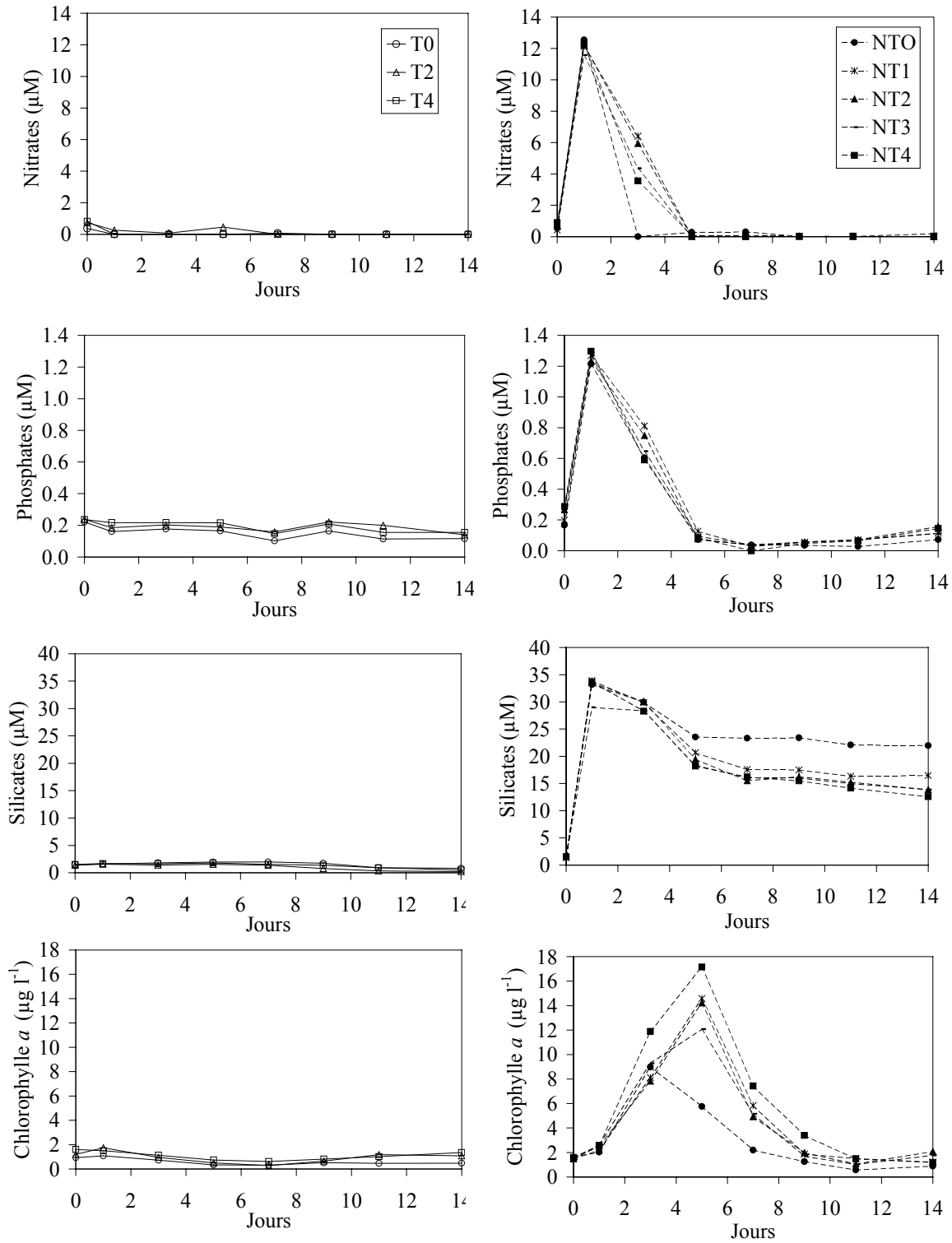


Figure IV-4 : Variations temporelles des concentrations en sels nutritifs (µM) et en chlorophylle *a* (µg l⁻¹) dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (à droite).

c) Mésocosmes enrichis (NT0 à NT4)

Les mésocosmes NT0 à NT4 ont été enrichis en sels nutritifs le jour 1 de l'expérience. Cette addition de sels nutritifs est illustrée par un pic marqué en début d'expérience (Figure IV-4, droite). La concentration en nitrates après addition est de $12,10 \pm 0,35 \mu\text{M}$. Dans le traitement sans turbulence (NT0), les nitrates sont consommés très vite, disparaissant dès le jour 3. Dans les containers soumis à la turbulence, la consommation est moins rapide : les nitrates atteignent des valeurs inférieures à $0,05 \mu\text{M}$ à partir du jour 5. La concentration en phosphates après enrichissement est de $1,26 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Le rapport N/P des sels nutritifs lors de l'enrichissement est donc de l'ordre de 9,6. Les phosphates sont consommés rapidement jusqu'au 5^{ième} jour pour atteindre des valeurs inférieures à $0,07 \mu\text{M}$ jusqu'au 11^{ième} jour. On note cependant une légère augmentation en fin d'expérience, liée probablement aux processus de reminéralisation bactérienne. Après enrichissement, les concentrations en silicates sont de l'ordre de $32,67 \pm 2 \mu\text{M}$. Ils sont consommés dès le début de l'expérience et diminuent régulièrement durant les 14 jours dans les 5 mésocosmes. En fin d'expérience, les concentrations en silicates varient de $13,8 \mu\text{M}$ (dans NT2, NT3 et NT4) à $21,98 \mu\text{M}$ (dans NT0).

Consécutivement à ce fort enrichissement en sels nutritifs, la biomasse phytoplanctonique se développe pour atteindre de fortes concentrations (jusqu'à $17,15 \mu\text{g l}^{-1}$ Chl *a* le jour 5 dans NT4). L'efflorescence a lieu le jour 3 dans NT0, et le jour 5 dans les autres mésocosmes, dès que les sels nutritifs, en particulier les nitrates sont consommés (Figure IV-4, en bas, à droite). La communauté phytoplanctonique à l'origine de cette floraison est composée principalement de diatomées (Figure IV-5). Les concentrations maximales sont respectivement de 198 et 195×10^5 cellules l^{-1} dans NT2 et NT3, de 176×10^5 cellules l^{-1} dans NT4, de 153×10^5 cellules l^{-1} dans NT1 et enfin de 107×10^5 cellules l^{-1} dans NT0. La phase de dégénérescence débute rapidement, à partir du jour 5, une fois les sels nutritifs consommés. La composition spécifique dans ces mésocosmes est dominée par *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira sp.*, espèces majoritaires lorsque le milieu est riche en sels nutritifs.

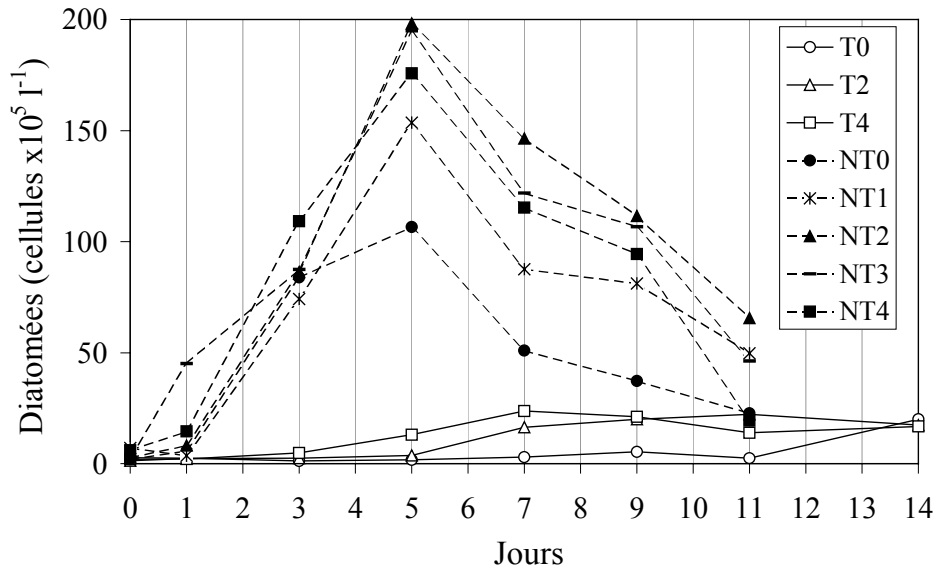


Figure IV-5 : Evolution temporelle du nombre de cellules de diatomées ($\times 10^5 \text{ l}^{-1}$) durant les 14 jours d'expérience.

2. Dynamique des TEP

Dans les mésocosmes sans ajout de sels nutritifs, la concentration volumique en TEP est relativement faible et augmente de façon constante avec le temps (Figure IV-6). Elle varie de 2,87 à 9,38 ppm en 14 jours, dans le traitement sans turbulence (T0), de 3,81 à 10,32 ppm avec le niveau de turbulence intermédiaire (T2), et de 2,44 à 24,22 ppm lorsqu'une forte turbulence est appliquée (T4). Même s'il n'y a pas de forte formation de TEP dans les mésocosmes non enrichis comparativement aux mésocosmes enrichis, le volume total des TEP est multiplié par 10 en 14 jours dans le traitement soumis à une forte turbulence (T4) alors qu'il est multiplié par 3 dans T0 et T2.

Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (Figure IV-6), la dynamique des TEP est fortement marquée. Durant les trois premiers jours d'expérience, les concentrations volumiques sont similaires à celles trouvées dans les containers non enrichis. On observe ensuite une forte augmentation quelle que soit l'intensité de turbulence. Cependant, comme dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs, les valeurs observées sont maximales en conditions de forte turbulence (NT4). La fraction volumique des TEP est alors multipliée par 75 en 14 jours et atteint des valeurs de 380 ppm. Dans NT2 et NT3, les variations sont similaires, avec une forte augmentation du jour 3 au jour 7 puis une stabilisation. Sans turbulence (NT0), les valeurs sont minimales.

D'une façon générale, la concentration volumique des TEP est supérieure dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT > T). Et pour des conditions trophiques initiales similaires, elle est maximale lorsque l'intensité de turbulence est très forte (niveau 4 soit $1 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$).

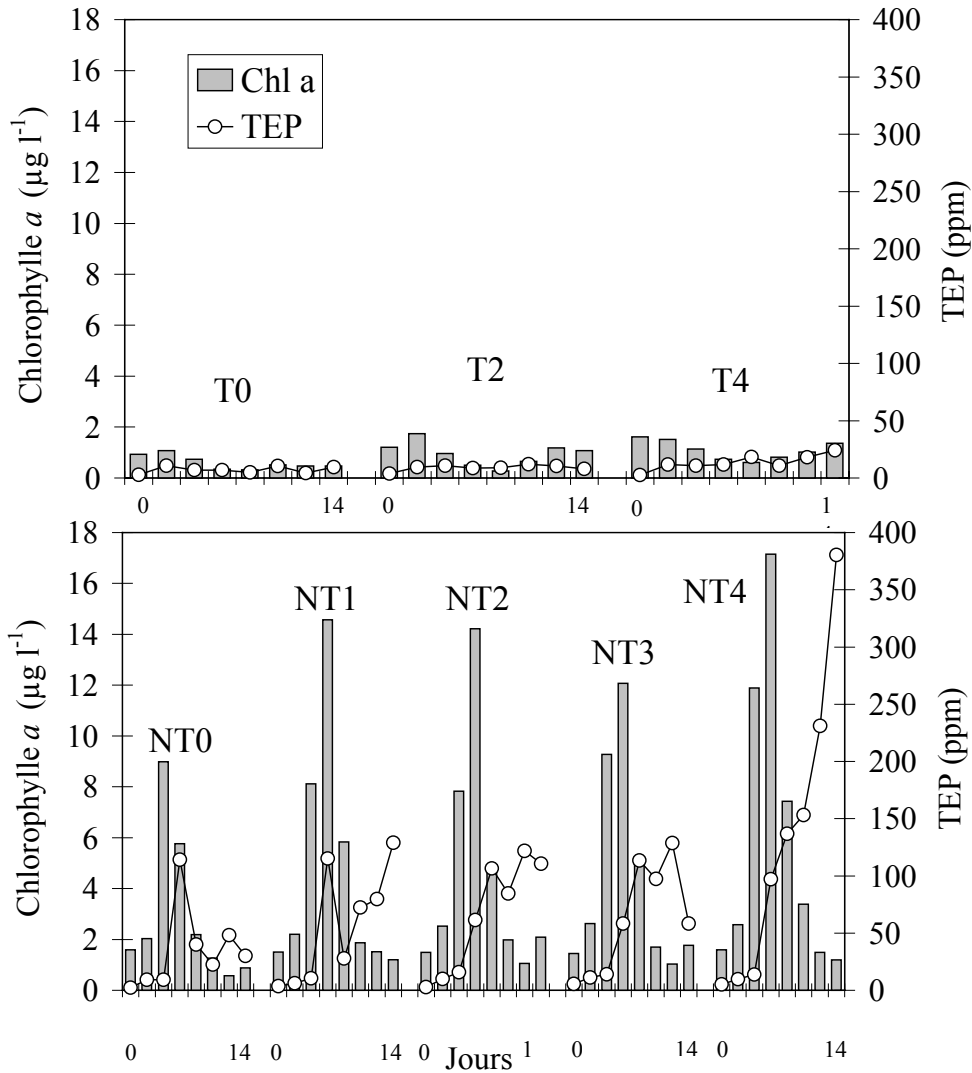


Figure IV-6 : Evolution de la concentration en TEP (ppm ; lignes continues) et de la concentration en chlorophylle *a* ($\mu\text{g l}^{-1}$; barres grisées) durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes non enrichis (en haut) et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (en bas).

On observe significativement plus de TEP dans les mésocosmes où la communauté phytoplanctonique s'est développée. La dynamique générale des TEP dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs ressemble à celle observée *in situ*, durant une efflorescence de diatomées, caractérisée par une forte augmentation durant la floraison ou au début de la phase

de dégénérescence du phytoplancton. Globalement on observe une persistance de ce pool de matière organique après le déclin de la floraison

Le rapport N/P des sels nutritifs est toujours inférieur à 16. Le phytoplancton ainsi que les bactéries se trouvent rapidement en conditions sévères de limitation en azote mais ne sont jamais limitées en phosphore. Plus le rapport N/P devient faible et plus la concentration volumique en TEP est élevée (Figure IV-7). Dans les mésocosmes enrichis, lorsque le rapport N/P devient inférieur à 5 environ, on observe une augmentation de type exponentiel de l'abondance en TEP.

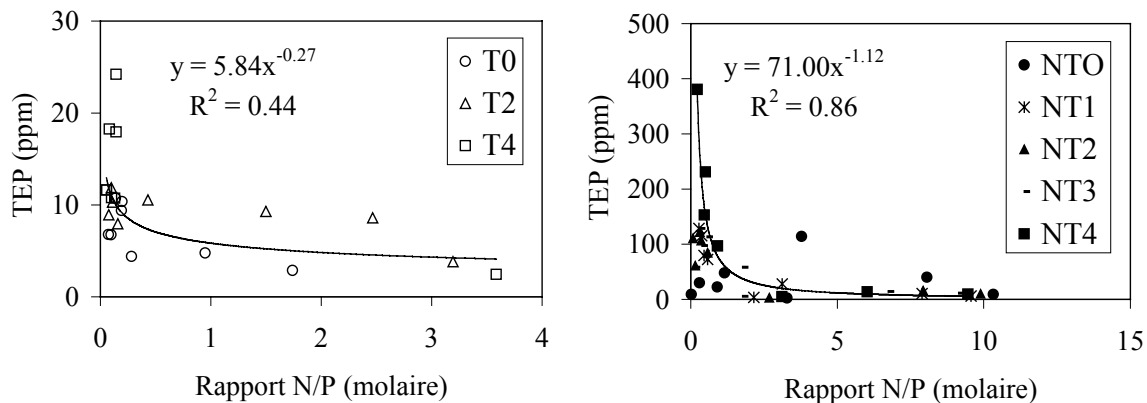


Figure IV-7 : Concentration volumique en TEP (ppm) en fonction du rapport N/P dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et enrichis en sels nutritifs (à droite). Les échelles sont différentes.

3. Dynamiques du carbone et de l'azote

Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, le carbone organique particulaire (COP) et l'azote organique particulaire (NOP) sont étroitement liés durant la phase exponentielle de croissance du phytoplancton, jusqu'au jour 3 ($y = 6,3x + 3,2$; $R^2 = 0,99$; $n = 8$, Figure IV-8). Le rapport COP/NOP est alors de 6,3, proche du rapport de Redfield. Lorsque les sels nutritifs azotés sont épuisés à partir du jour 5, les dynamiques du COP et du NOP sont découplées : tandis que les concentrations en azote organique particulaire augmentent légèrement, celles du COP doublent presque, induisant une augmentation forte du rapport COP/NOP (Figure IV-9).

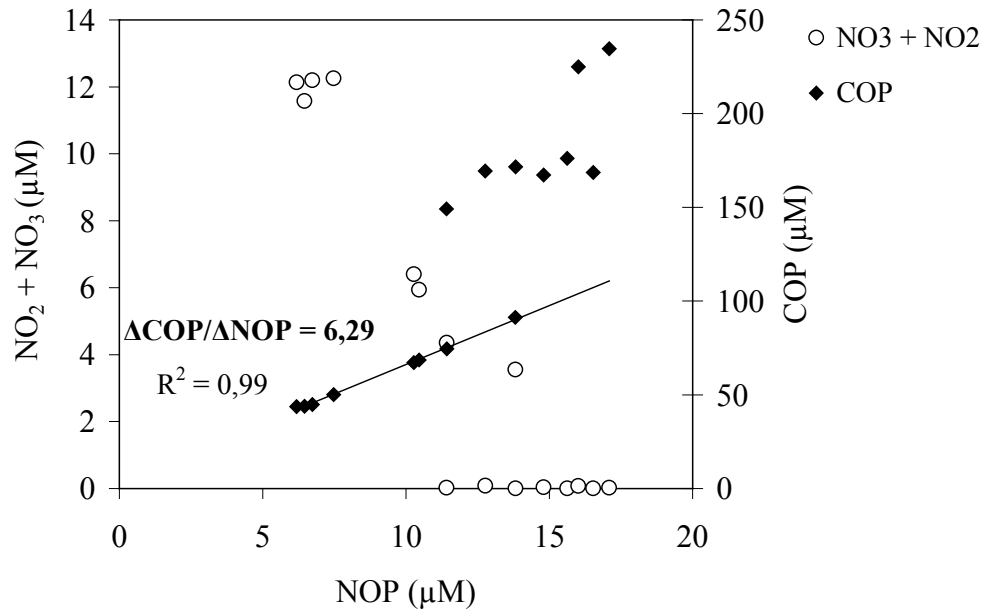


Figure IV-8 : Découplage des dynamiques du carbone et de l'azote durant la floraison, dans les mésocosmes (NT1 à NT4).

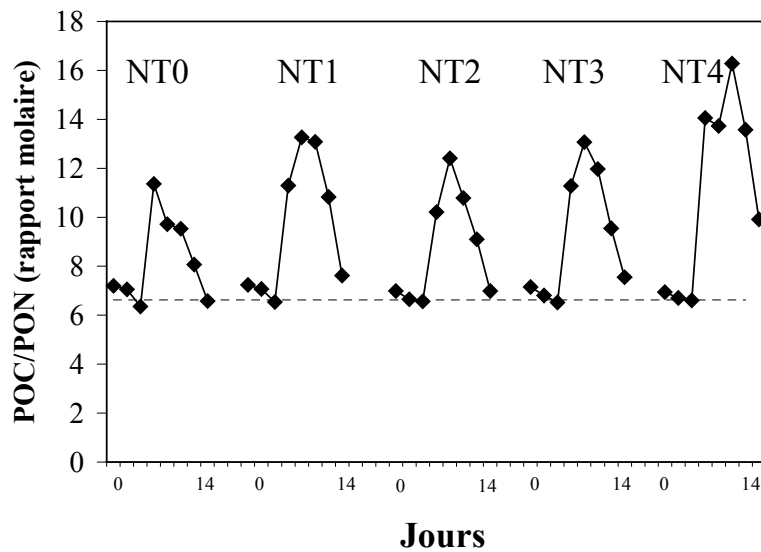


Figure IV-9 : Evolution du rapport molaire du carbone organique particulaire (COP) versus l'azote organique particulaire (NOP) dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs. La ligne horizontale discontinue illustre le rapport de Redfield (C/N =106/16).

Ce découplage du carbone et de l'azote est probablement lié à la formation des TEP (Figure IV-10). En effet, à partir du jour 5, quelle que soit la turbulence, la concentration en carbone lié aux TEP (TEP-C), augmente fortement. Ceci coïncide avec un épuisement en nitrates et une baisse de la production primaire. De plus, les valeurs maximales du rapport COP/NOP sont observées dans NT4 lors de la phase de dégénérescence du phytoplancton (C/N de 16,3), en concomitance avec des valeurs maximales de TEP-C (460 μM).

Les valeurs estimées de TEP-C peuvent être supérieures aux valeurs de COP. Cette incohérence est expliquée au chapitre III. Même si ces valeurs sont probablement surestimées, l'évolution de la concentration en TEP-C en fonction du temps n'est pas remise en cause.

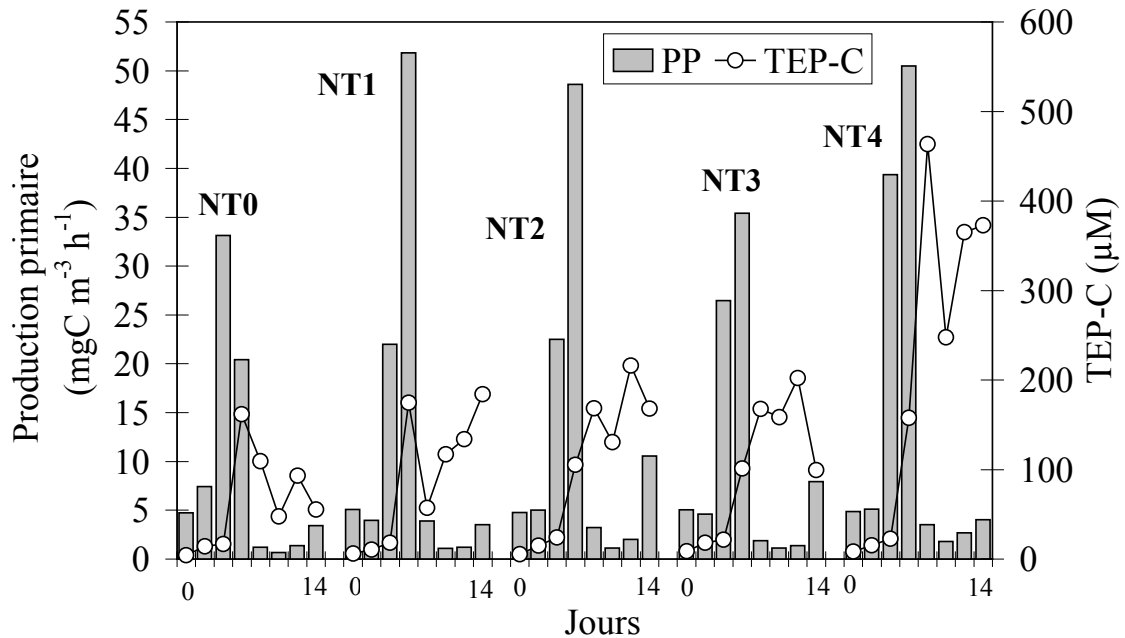


Figure IV-10 : Evolution de la concentration en carbone lié aux TEP (TEP-C en μM ; lignes continues) et de la production primaire ($\text{mgC m}^{-3} \text{ h}^{-1}$; barres grisées) durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.

Considérant les dynamiques du carbone et de l'azote dans les mésocosmes enrichis, la période d'étude peut être divisée en trois phases. Premièrement, une phase exponentielle pour le phytoplancton, s'étendant jusqu'au jour 3, induisant une forte diminution des nitrates jusqu'à épuisement. Durant cette phase, le carbone et l'azote particuliers sont fortement corrélés avec un rapport COP/NOP proche de celui de Redfield. Puis une phase d'épuisement des nitrates à partir du jour 5, suivie d'une augmentation forte du COP et du pool de TEP entraînant une élévation générale du rapport C/N de la matière organique particulaire. Enfin, une dernière phase, en fin d'expérience, durant laquelle on observe une diminution du rapport C/N de la MOP pour atteindre des valeurs à nouveau proches du rapport de Redfield.

4. Effet de la turbulence sur la dynamique des TEP

a) Effet de la turbulence sur la production et la sédimentation des TEP

De façon générale, la production de TEP normalisée par la biomasse phytoplanctonique est supérieure dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (Figure IV-11). La production des TEP durant la période de floraison n'est pas accélérée dans T4 et NT4 comparativement aux autres traitements. Du jour 5 au jour 9, on observe même une production relativement faible et constante dans NT4 tandis qu'elle augmente régulièrement dans NT2 et NT3. Cette approche est assujettie à une forte incertitude à savoir que l'on considère qu'il n'y a pas de perte de matériel au système. Il est donc indispensable d'estimer l'exportation éventuelle de matériel par sédimentation afin de pouvoir conclure quant à l'éventuelle production de TEP.

Afin d'estimer la perte de matériel organique par sédimentation, nous avons procédé en une remise en suspension de l'eau des mésocosmes à la fin du 14^{ième} jour d'expérience. La Figure IV-12 représente le facteur d'enrichissement en TEP et en chlorophylle *a* après mélange de la colonne d'eau. Un facteur supérieur à 1 signifie que la concentration en matériel après remise en suspension est plus importante illustrant un phénomène de sédimentation.

Globalement, le flux vertical de matière est plus important dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs. La production estimée de TEP dans NT2 et NT3 est relativement forte en période de floraison comparativement à NT4 (Figure IV-11). Or l'expérience de remise en suspension révèle une forte sédimentation dans NT2 et NT3. Ces résultats indiquent donc que la production de TEP dans ces mésocosmes est en réalité fortement sous-estimée. Elle serait même plus importante que dans les mésocosmes soumis à une intensité maximale de turbulence (T4 et NT4). En effet, une forte turbulence (T4 et NT4) empêche significativement les TEP et les cellules phytoplanctoniques de sédimenter. Ainsi, les fortes valeurs de production de TEP estimées dans NT4 en fin d'expérience (Figure IV-11), témoigneraient en réalité de la persistance de ce pool de matière en surface. De plus, malgré une forte sédimentation, la fraction volumique des TEP reste relativement stable en fin d'expérience dans NT2 (Figure IV-6). La formation de TEP dans ce mésocosme serait égale à la perte par sédimentation. Les niveaux intermédiaires de turbulence n'empêchent donc pas la sédimentation de matériel lorsque celui-ci est produit en forte quantité.

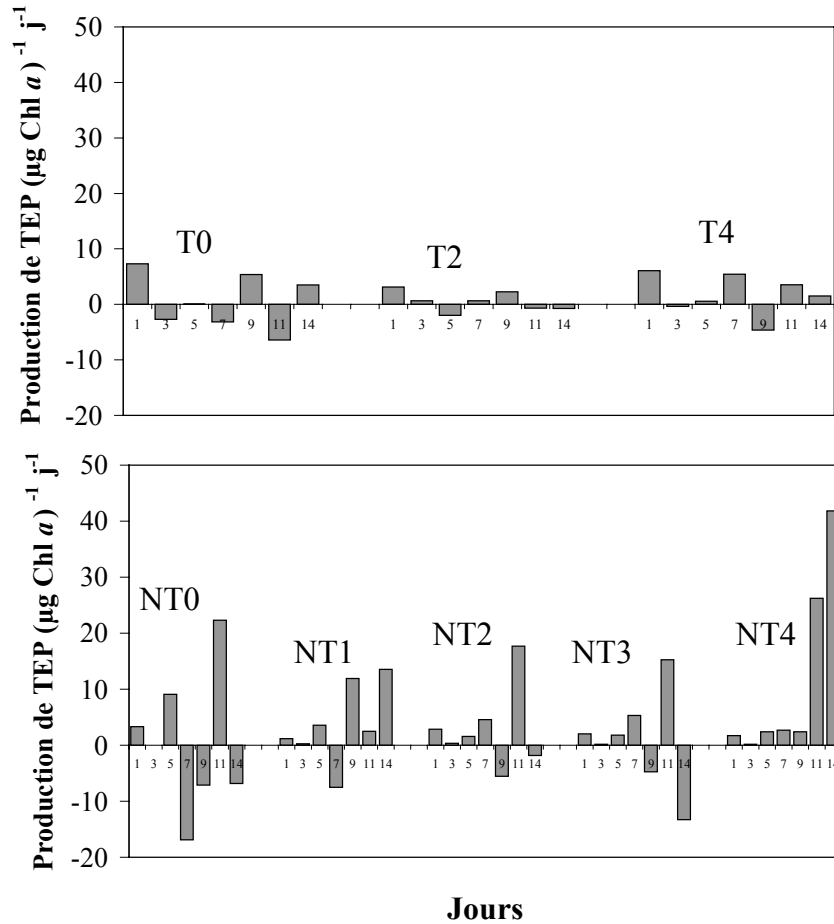


Figure IV-11 : Production journalière de TEP (ppm) normalisée par la biomasse phytoplanctonique (µg chl a) dans les mésocosmes non enrichis (en haut) et dans les mésocosmes enrichis (en bas).

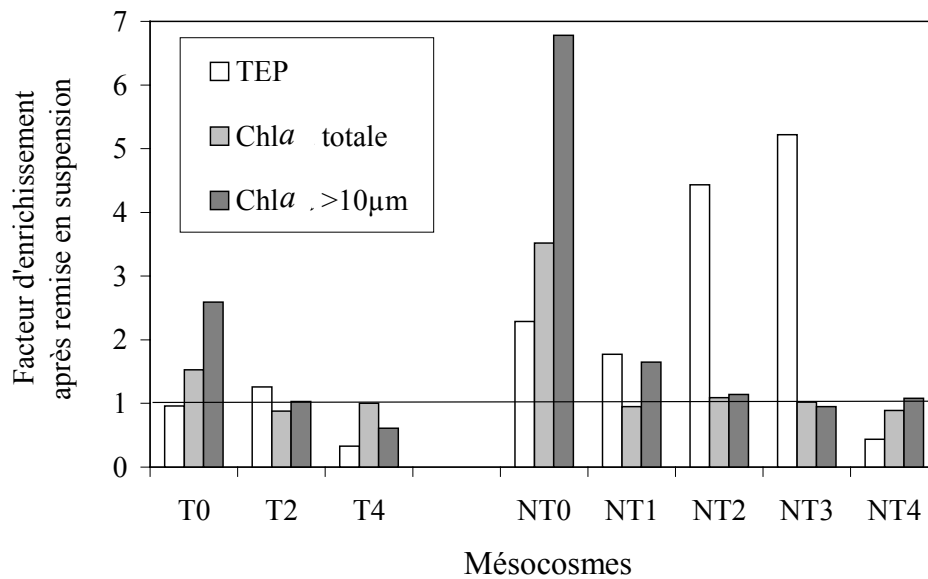


Figure IV-12 : Facteur d'enrichissement des TEP, de la chlorophylle a totale et de la fraction supérieure à 10 µm après remise en suspension de l'eau des mésocosmes. Ce facteur illustre une perte par sédimentation.

Plus l'intensité de turbulence est élevée et moins le phytoplancton (total et supérieur à 10 µm) sédimente. La sédimentation des TEP et celle du phytoplancton sont faiblement liées suggérant que les TEP ne contrôlent pas totalement la sédimentation du phytoplancton.

b) Effet de la turbulence sur la distribution de taille des TEP

Le spectre de taille des TEP obéit à une loi de puissance décroissante (Figure IV-13). L'ensemble des spectres est présenté en annexe C. L'effet de la turbulence sur les spectres de taille diffère selon les conditions trophiques initiales. Dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs, la pente des spectres de taille des TEP ne varie pas en fonction de l'intensité de turbulence (Figure IV-14).

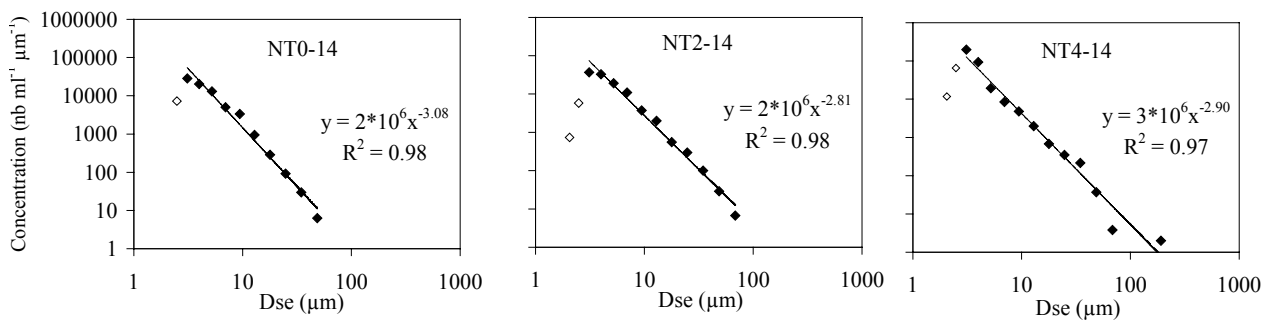


Figure IV-13 : Exemples de spectres de taille des TEP, dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT0, NT2, NT4) au quatorzième jour de l'expérimentation. Les droites de régression $dN/d[dp]=kdp^\delta$ ont été réalisées sans considérer les deux premières classes de taille (symboles vides).

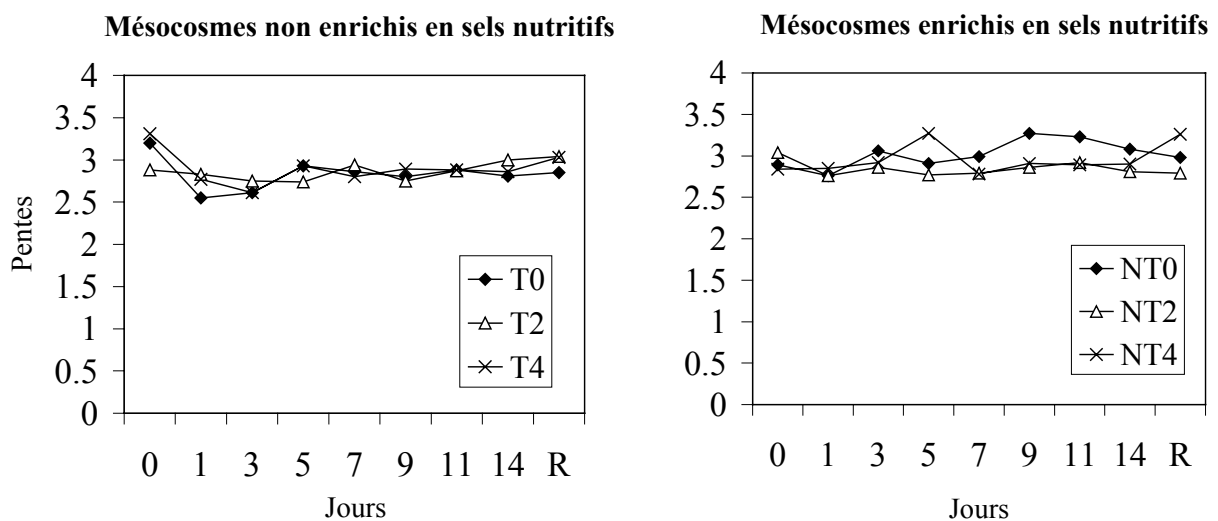


Figure IV-14 : Variations temporelles des pentes (valeurs absolues) des spectres de taille des TEP dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs (T ; gauche) et enrichis en sels nutritifs (NT ; droite). (R = expérience de remise en suspension).

Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, les pentes sont inférieures (en valeur absolue) dans les mésocosmes soumis à la turbulence (NT2 et NT4), comparativement au mésocosme stagnant (NT0). Ceci implique une contribution moindre des petites particules, ou à l'inverse, une contribution plus importante des grandes, dans NT2 et NT4.

Les classes de taille des TEP ont été divisées en quatre sous-classes principales comme il a été décrit au chapitre I (Figure IV-15). En termes de volume, les TEP inférieures à 2 μm sont quasi-inexistantes (moins de 3%), elles ne sont observées que lors des conditions initiales, puis disparaissent très vite quel que soit le traitement. Les TEP de 2 à 28 μm représentent la majeure part.

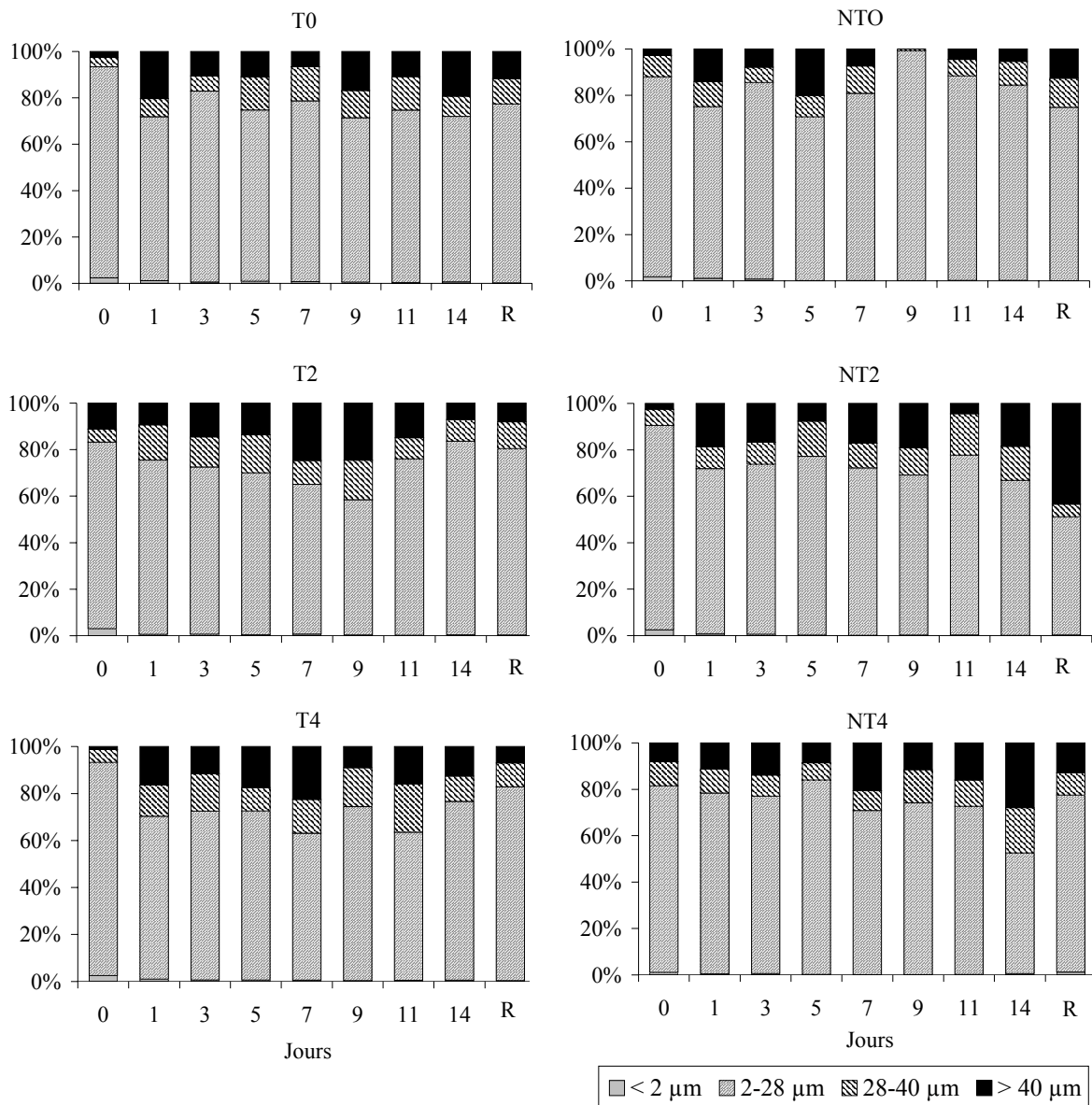


Figure IV-15 : Contribution des différentes classes de taille des TEP, en termes de volume, dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (à droite). (R = expérience de remise en suspension).

On n'observe pas d'effet de la turbulence sur la distribution de taille des TEP dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs. Dans T0, la contribution des TEP supérieures à 28 μm reste globalement constante à partir du jour 1 ($25\% \pm 4\%$). Dans T2 et T4 les TEP supérieures à 28 μm deviennent de plus en plus nombreuses jusqu'en milieu d'expérience. Elles augmentent d'un facteur 2,5 dans T2 et d'un facteur 6,2 dans T4. En fin d'expérience leur contribution diminue. Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs la contribution des TEP supérieures à 28 μm semble plus élevée sous l'influence de la turbulence (NT2 et NT4) comparativement au traitement statique (NT0). Dans celui-ci, elles représentent en moyenne 16% jusqu'au jour 14, tandis que dans NT2 et NT4 elles représentent respectivement 25% et 26%. Dans NT2, on n'observe pas de tendance à l'agrégation jusqu'au jour 14. Cependant, la remise en suspension entraîne la réapparition de très grandes particules supérieures à 40 μm (43%) qui ont sédimenté durant l'expérience. Ceci est illustré à la Figure IV-16 où le volume total des TEP augmente fortement après remise en suspension dans NT2. Dans NT4, les TEP supérieures à 28 μm contribuent pour 48% de l'ensemble des particules le jour 14. Tandis que l'abondance en TEP reste relativement stable du jour 11 au jour 14, leur volume total augmente (Figure IV-16), suggérant d'éventuels processus de coagulation et d'agrégation. La remise en suspension entraîne la réapparition de davantage de petites particules dans NT4.

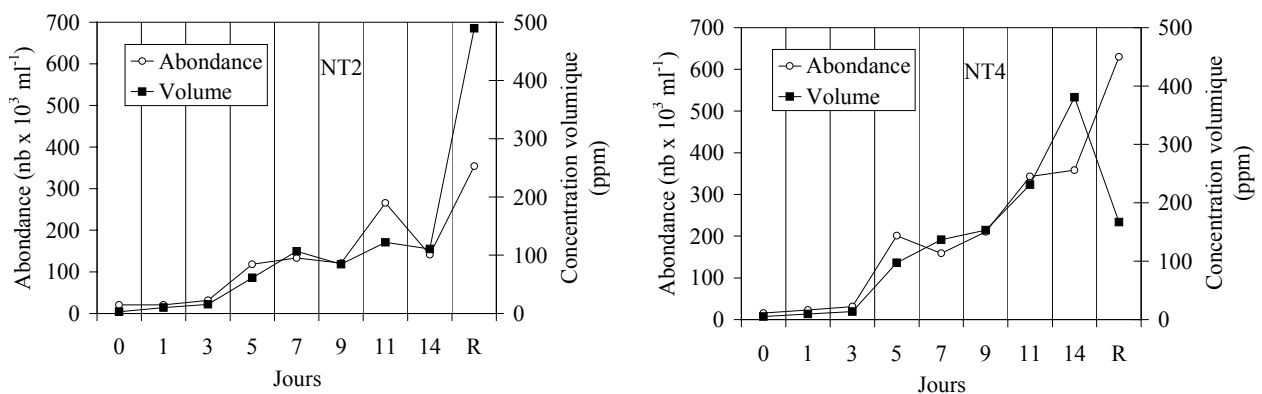


Figure IV-16 : Evolution de l'abondance (nb x 10³ ml⁻¹) et de la concentration volumique (ppm) en TEP au cours des 14 jours d'expérience dans NT2 (gauche) et NT4 (droite). R = remise en suspension.

En résumé, il semble qu'il existe un effet de la turbulence sur la distribution de taille des particules dans les mésocosmes enrichis en sel nutritifs : la turbulence semble augmenter la contribution des plus grandes particules. De plus, l'intensité maximale (niveau 4), maintient les TEP en suspension entraînant leur agrégation (Figure IV-17), tandis que le niveau de turbulence intermédiaire (niveau 2) n'empêche pas le matériel de sédimer.

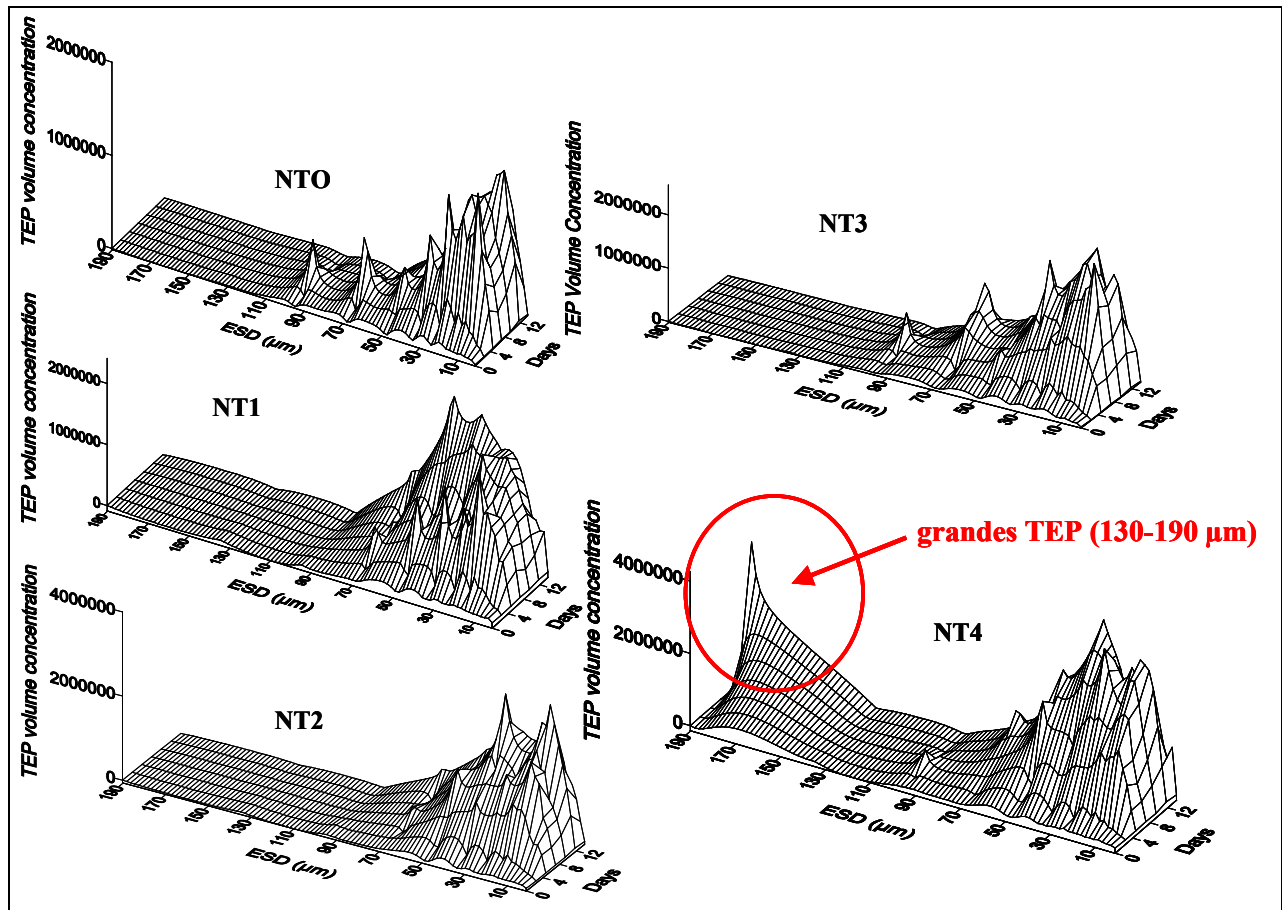


Figure IV-17 : Concentrations volumiques des TEP ($\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$) dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, en fonction de leur diamètre de sphère équivalente (Dse, μm) sur la durée de l'expérience (jour 0 au jour 14). (issu de Beauvais & Pedrotti 2002). L'échelle est différente selon les graphes.

5. Impact de la turbulence sur les relations TEP/bactéries

La concentration en TEP et l'abondance bactérienne dans les mésocosmes ne sont pas significativement corrélées (Tableau IV-II). Cependant, dans NT1 et NT4, plus les TEP sont abondantes et plus la production bactérienne est élevée (Figure IV-18).

Tableau IV-II : Corrélations (test du coefficient de corrélation r de Pearson) entre l'abondance bactérienne (Bact.), la production bactérienne (PB) et la concentration volumique des TEP, dans chacun des mésocosmes ($n = 8$).

	T0	T2	T4	NT0	NT1	NT2	NT3	NT4
Bact.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PB	ns	ns	ns	ns	$R^2 = 0,67$ $p < 0,05^*$	ns	ns	$R^2 = 0,80$ $p < 0,01^{**}$

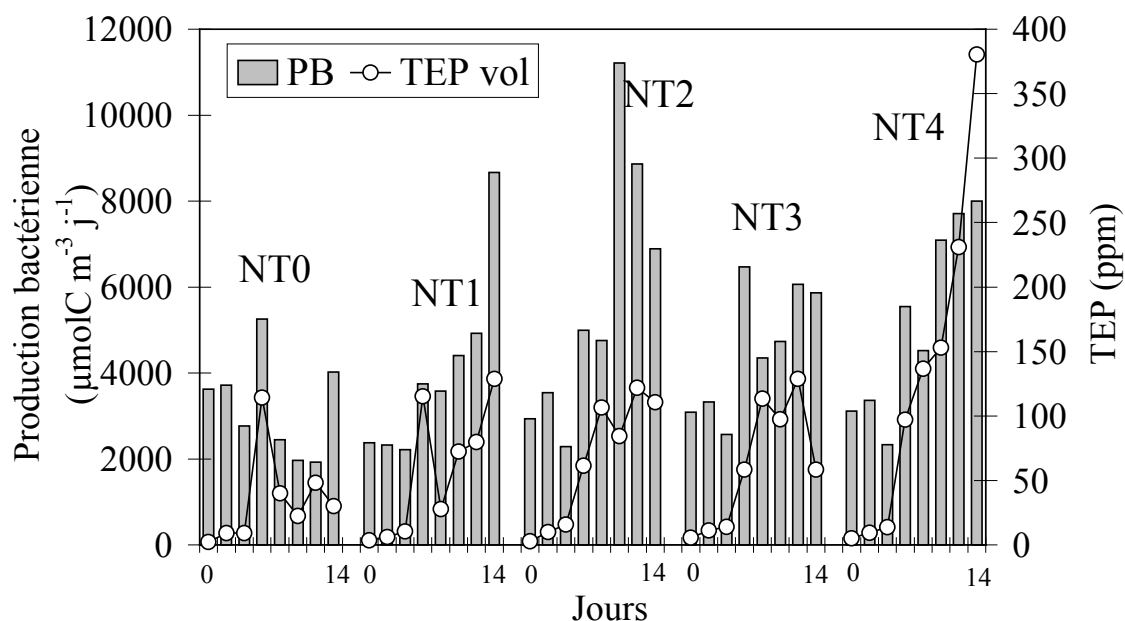


Figure IV-18 : Evolution de la concentration en TEP (ppm ; lignes continues) et de la production bactérienne ($\mu\text{molC m}^{-3} \text{j}^{-1}$; barres grises) durant les 14 jours d'expérience dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs.

Les particules exopolymériques transparentes sont majoritairement colonisées par des bactéries (Tableau IV-III). En moyenne, $80\% \pm 14\%$ des TEP sont colonisées. Il n'y a pas de différence significative entre les traitements (ANOVA ; $p < 0,05$). Les résultats ne permettent pas de noter une évolution significative avec la durée de l'expérience.

Tableau IV-III : Pourcentages de TEP colonisées par des bactéries dans les mésocosmes (%).

Jours	T0	T2	T4	NT0	NT2	NT4
0	92	76	99	86	94	78
1	62	83	58	68	66	93
3	78	100	82	92	58	97
5	81	94	93	86	66	100
7	78	100	78	51	84	72
11	54	79	63	60	68	84

Lors des conditions initiales, la part des bactéries attachées aux TEP représente de 4 à 36% des bactéries totales (Tableau IV-IV). De façon générale, le pourcentage de bactéries attachées est plus élevé en fin d'expérience. Dans les mésocosmes non enrichis, après 11 jours d'expérience, 58%, 93% et 77% des bactéries présentes sont attachées aux TEP, respectivement dans T0, T2 et T4.

Tableau IV-IV : Pourcentage de bactéries attachées aux TEP par rapport aux bactéries libres.

Jours	T0	T2	T4	NT0	NT2	NT4
0	36	29	21	14	20	4
1	31,5	51	35	21	35,5	16
3	22	21	33,5	22	35	17
5	18,5	17,5	26	24	53	21
7	26	44	33	13	53	39
11	58	93	77	32	13	19

Le nombre de bactéries agrégées aux TEP augmente avec la taille de ces particules selon une loi de puissance du type $n = ad^b$ (Figure IV-19).

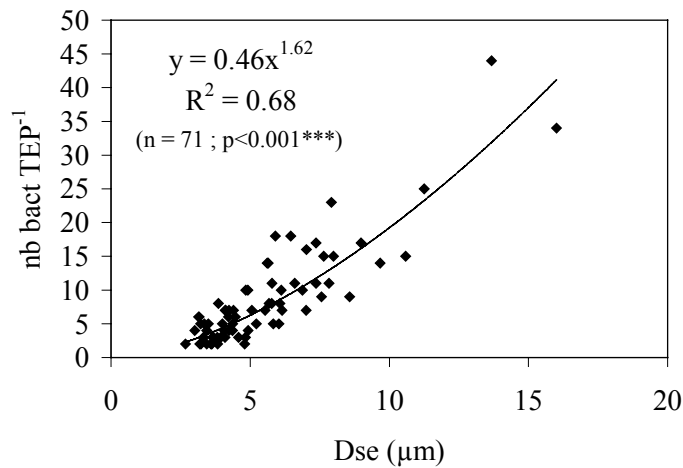


Figure IV-19 : Nombre de bactéries par TEP en fonction du diamètre de sphère équivalente des TEP (Dse, μm). Exemple dans NT4, après 5 jours d'incubation.

L'intensité de turbulence et les conditions trophiques du milieu ont-ils un effet sur la colonisation bactérienne des TEP ?

Lors des conditions initiales (Jour 0) les pentes des droites de régression ne sont pas significativement différentes entre les mésocosmes (Tableau IV-V). Ces résultats servent de témoins : dans l'eau de mer naturelle, avant traitement, la colonisation bactérienne des TEP en fonction de la taille des TEP est identique dans tous les mésocosmes.

Tableau IV-V : Résultats de l'ANCOVA pour 2 x 3 échantillons indépendants. k = nombre de groupes, n = effectif.

	F	ddl (k-1 ; n-k-1)	p	Bilan
Jour 0				
Effet Sels nutritifs (A)	2,29	1 ; 424	0,13	Pas d'effet
Effet turbulence (B)	16,15	2 ; 423	6,75	Pas d'effet
Interaction A x B	21,47	2 ; 423	5,01	Pas d'effet
Jour 11				
Effet Sels nutritifs (A)	1,61	1 ; 525	0,20	Pas d'effet
Effet turbulence (B)	5,22	2 ; 524	0,005	Effet
Interaction A x B	3,86	2 ; 524	0,02	Effet

En fin d'expérience (Jour 11), l'addition de sels nutritifs n'a pas d'effet sur la colonisation bactérienne ($p > 0,05$), tandis que la turbulence a un effet significatif ($p < 0,01$). Pour un diamètre donné de particules on observe davantage de bactéries sous l'influence de la turbulence (Figure IV-20). La turbulence favoriserait donc la colonisation des TEP par les bactéries. L'interaction significative entre les facteurs A et B montre que l'effet de la turbulence n'est pas indépendante des conditions trophiques. Sans sels nutritifs, l'effet de la turbulence est fortement marqué : les pentes T2 et T4 sont proches et significativement supérieures à T0. Après enrichissement en sels nutritifs, l'effet de la turbulence est davantage prononcé dans NT4 par rapport à NT2.

Afin de mieux apprécier la charge bactérienne des TEP, en fonction de la taille de ces particules, nous avons normalisé le nombre de bactéries par surface de TEP ($\text{nb } \mu\text{m}^{-2}$). La densité bactérienne diminue avec l'augmentation de la taille des TEP dans tous les mésocosmes (Figure IV-21). Les petites TEP sont donc colonisées davantage comparativement aux plus grandes. L'ensemble des figures est présenté en annexe D.

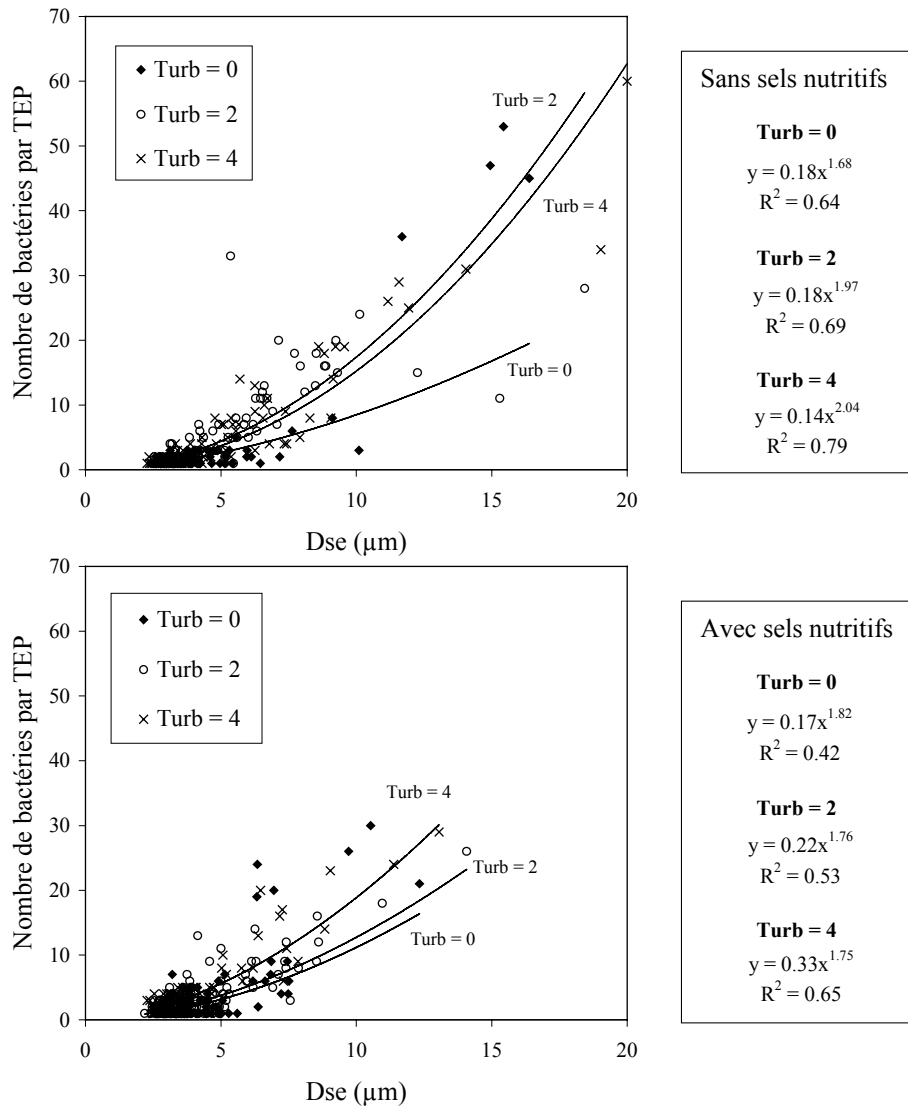


Figure IV-20 : Résultats de l'ANCOVA : Effet de la turbulence sur la colonisation bactérienne des TEP, dans les mésocosmes non enrichis (haut) et enrichis en sels nutritifs (bas), le onzième jour d'expérimentation.

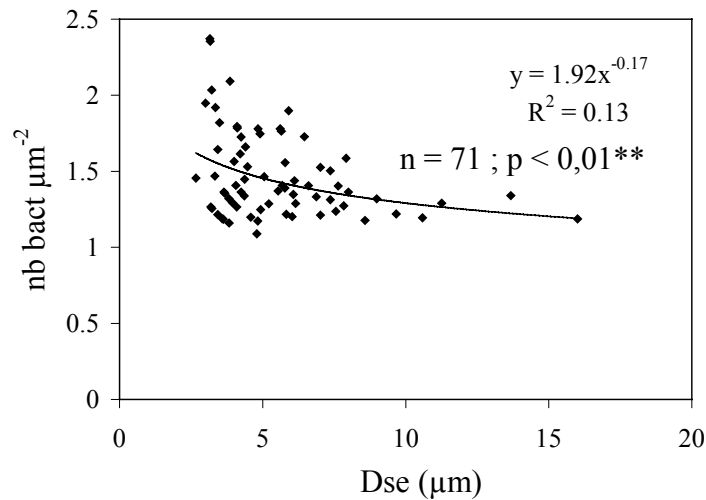


Figure IV-21 : Nombre de bactéries agrégées par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm). Exemple dans NT4, après 5 jours d'incubation.

D. DISCUSSION

1. Source des TEP

En milieu naturel, les TEP sont généralement associées aux floraisons phytoplanctoniques, en particulier lorsque les diatomées sont dominantes (Passow & Alldredge 1994, Passow & Alldredge 1995a, Mari & Kiørboe 1996, Grossart & Simon 1997, Mari & Burd 1998). Dans cette étude, *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira sp.* sont à l'origine des fortes productions de TEP, observées dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs. La production de TEP varie selon les espèces phytoplanctoniques (Passow 2002b). Des études en culture ont montré que *Thalassiosira sp.* pouvait induire la formation de ces particules (Passow & Alldredge 1994, Aluwihare & Repeta 1999) et que *Skeletonema costatum* produisait des exsudats très collants facilitant leur coagulation avec les cellules algales, en particulier durant la phase de dégénérescence (Kiørboe & Hansen 1993). Engel (2000) a également décrit l'agrégation d'une efflorescence de *Skeletonema costatum* en microcosme. Cet auteur a montré d'une part, qu'il y a formation de TEP à un stade avancé de sénescence, quand la concentration en diatomées décline de 80%, et d'autre part, que le coefficient d'adhésion des particules augmente durant cette phase induisant une forte persistance des agrégats dans la colonne d'eau jusqu'à 18 jours après le pic de la floraison. Nos résultats corroborent parfaitement ceux de Engel (2000) puisque l'on observe de fortes concentrations de TEP notamment après l'efflorescence phytoplanctonique (Figure IV-6).

Dans une moindre mesure, le bactérioplancton peut aussi être à l'origine de la formation des TEP. Les bactéries participent en effet à la formation de ces particules car elles produisent des polysaccharides sous forme d'exopolymères libres, de capsule ou de film (Decho 1990). Bien que les expériences en culture ont montré que les bactéries généraient de fortes quantités de TEP (Grossart 1999, Passow 2002a), *in situ*, leur production apparaît de moindre importance (Schuster & Herndl 1995). Stoderegger & Herndl (1999) ont estimé à partir d'expérience en mésocosme remplis d'eau de mer naturelle, que les bactéries devaient contribuer pour seulement 1 à 3% du nombre total de particules exopolymériques en zone côtière de la mer du Nord. Ils ont également montré que la production des TEP issues des bactéries était 5 fois plus faibles en condition de turbulence. Notre étude ne permet pas de différencier les sources des TEP, mais étant données les fortes concentrations de diatomées,

nous considérerons que l'origine principale des TEP est l'exsudation de précurseurs par le phytoplancton.

2. Facteurs influençant la formation des TEP

a) Influence des conditions trophiques

L'émission d'exopolysaccharides par les organismes dépend des espèces impliquées, de l'état physiologique des individus et des conditions environnementales. Nos résultats ont montré qu'une forte limitation en azote pour le phytoplancton est à l'origine de la formation des TEP dans les mésocosmes. En conditions limitantes en azote, une large proportion du carbone fixé durant la photosynthèse est exsudée et acheminée vers les TEP (Mari 1999, Corzo *et al.* 2000, Mari *et al.* 2001). Obernosterer et Herndl (1995) ont montré qu'une limitation en phosphore induisait davantage la formation d'exsudats par les cellules algales qu'une limitation en azote. Penna *et al.* (1999) ont démontré que l'effet de la limitation en sels nutritifs (nitrates et/ou phosphates) sur l'excrétion de polysaccharides est spécifique à chaque espèce. *Skeletonema costatum* notamment, produit de larges quantités de mucus en conditions de limitation par l'azote, et non par le phosphore. Or, dans notre étude le phytoplancton est très vite limité en azote. Au vu des résultats de Penna *et al.* (1999), *Skeletonema costatum* doit être à l'origine des fortes augmentations de la concentration en TEP dans les mésocosmes enrichis.

Le statut trophique d'un milieu est caractérisée de différentes façons. Eppley & Peterson (1979) utilisent le rapport f comme indice du statut trophique (rapport entre la production nouvelle et la production totale). Le rapport entre la biomasse des pigments de grandes espèces phytoplanctoniques et celle des pigments totaux est également utilisé (rapport F_p ; Claustre 1994). Enfin, le rapport N/P des sels nutritifs est aussi un indicateur des conditions trophiques d'un système (Marty *et al.* 2002). Dans les mésocosmes enrichis, lorsque le rapport N/P devient inférieur à 5, on observe une augmentation de type exponentiel de l'abondance en TEP. Ces résultats suggèrent que sous un certain seuil, la production de polysaccharides extracellulaires devient exponentielle reflétant un flux important de matière organique de la cellule vers le milieu externe. Dans les mésocosmes non enrichis où la formation des TEP est faible, il est plus difficile de conclure, cependant le même type de distribution est observé. Ce seuil pourrait-il être un indicateur du statut trophique du milieu ? La formation des TEP pourrait-elle être un indice de limitation en sels nutritifs pour le

phytoplancton ? De futures investigations sont nécessaires afin de savoir si les TEP pourraient représenter un indice du statut trophique au même titre que les rapports f et F_p .

Néanmoins un paradoxe persiste. Puisque la formation de TEP est intense lorsque les cellules phytoplanctoniques sont limitées en sels nutritifs, pourquoi, dans les containers non enrichis, bien que le milieu soit très vite limité en azote, n'observe-t-on pas de fortes productions de TEP (Figure IV-11)? L'état de croissance du phytoplancton semble être impliqué dans ce processus. La formation des TEP est particulièrement importante en phase de floraison et de dégénérescence du phytoplancton or dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs, la communauté phytoplanctonique ne se développe pas. Plus que la biomasse c'est l'état physiologique du phytoplancton qui gouverne majoritairement la production de TEP.

b) Influence de la turbulence

Nous n'avons pas observé d'effet direct de la turbulence sur la production des TEP (Figure IV-11). Cependant, plus l'intensité de turbulence augmente et plus les diatomées à l'origine de la formation des TEP, se développent (Figure IV-5). Cette relation positive entre l'énergie cinétique turbulente et l'intensité de l'efflorescence phytoplanctonique confirme le rôle de l'énergie exosomatique (mécanique) dans le contrôle des systèmes naturels planctoniques (Margalef 1978). Alcaraz *et al.* (2002) et Arin *et al.* (2002) ont obtenu des résultats similaires en expérience de microcosmes. Il a été suggéré que la turbulence à petite échelle favoriserait les grandes cellules phytoplanctoniques non mobiles en les maintenant dans la zone euphotique et en augmentant les flux de nutriments autour des cellules (Lazier & Mann 1989). Ainsi dans cette étude, l'effet de la turbulence sur la production de TEP est un effet indirect : la turbulence n'accélère pas la production des précurseurs des TEP mais elle augmente le nombre de cellules algales à l'origine de la formation des TEP. On pourrait parler dans ce cas d'un effet indirect de la turbulence, contrôlé par les ressources nutritives («bottom-up effect »).

3. Dynamiques du carbone et de l'azote

Le découplage des dynamiques du carbone et de l'azote après l'efflorescence phytoplanctonique peut être attribué, au moins en partie, à la formation des particules

exopolymériques transparentes. Il existe une forte co-variation du carbone et de l'azote en accord avec le rapport de Redfield tant que les TEP ne sont pas produites. Ensuite, la formation des TEP semble induire une modification de la stochiométrie de la matière organique avec des rapports C/N supérieurs au rapport de Redfield. Ces résultats en milieu contrôlé corroborent nos résultats *in situ* concernant le rôle des TEP dans la surconsommation de carbone inorganique dissous, observé en Méditerranée Nord-Occidentale (chapitre III). En effet, quand l'acquisition des nutriments limite la production de biomasse, mais non la photosynthèse, l'exsudation de polysaccharides et la formation consécutive de TEP seraient le résultat d'un surplus de carbone excrété par les cellules phytoplanctoniques. Lors d'expériences en mésocosmes de 1 m³, Engel *et al.* (2002) ont montré des résultats similaires. Ces auteurs ont estimé que la production de TEP pouvait expliquer 40% de la diminution de la concentration en carbone inorganique dissous (CID).

Il est généralement supposé que le carbone organique dissous (COD) n'est pas directement impliqué dans le phénomène de la pompe biologique de carbone vers les couches profondes car il ne sédimente pas. Si effectivement une part du carbone organique dissous est transféré via l'exsudation, vers les TEP, alors il pourra rejoindre le flux de particules. Ceci montre que les TEP pourraient jouer un rôle majeur dans la mesure où elles participeraient à la séquestration du carbone organique dissous sous forme particulaire. A plus grande échelle, la production de TEP serait reliée à l'assimilation de carbone atmosphérique (CO₂) par les océans (Engel 2002).

En fin d'expérience, le rapport C/N de la matière organique diminue pour atteindre des valeurs à nouveau proches du rapport de Redfield. Il semblerait qu'il existe des processus de régulation, permettant un nouveau couplage des dynamiques du carbone et de l'azote. La sédimentation des TEP riches en carbone peut expliquer une part de ce processus dans NT0, NT1, NT2 et NT3. Mais dans NT4, le flux vertical de TEP est négligeable (Figure IV-12). Sachant que les TEP sont largement colonisées par les bactéries dans NT4 et que la production bactérienne est également forte jusqu'en fin d'expérience, on peut également attribuer cette diminution générale du rapport C/N à l'assimilation des sucres carbonés par les bactéries. En effet, les ressources utilisées par les bactéries pour satisfaire leurs besoins en carbone, peuvent être le COP et le COD, et notamment la fraction ultralabile du COD. Ce pool est caractérisé par un taux de renouvellement à l'échelle de l'heure et est composé de sucres, d'acides aminés et de lipides (Van Wambeke *et al.* 2002b).

4. Effet de la turbulence sur l'agrégation et la sédimentation des TEP

Cette étude est la première à étudier le rôle de la turbulence sur la dynamique des particules exopolymériques en mésocosmes (9 m^3), remplis d'eau de mer naturelle et soumis à des intensités de turbulence contrôlées. Stoderegger et Herndl (1999) ont décrit la coagulation des TEP originaires de bactéries, soumises à deux intensités de turbulence. Mais il s'agissait d'expériences en milieu de culture de deux litres avec une turbulence générée par simple agitateur.

Dans les mésocosmes non enrichis en sel nutritifs, nous n'avons pas observé d'influence de la turbulence sur la distribution de taille des TEP. On observe davantage de grandes particules en milieu d'expérience dans T2 et T4, puis leur contribution diminue. Cette diminution n'est probablement pas liée à des processus de désagrégation des particules que pourrait induire la turbulence. En effet, la neige marine résiste aux fortes intensités de turbulence dans les eaux de surface. Seuls des événements orageux avec des vents supérieurs à 20 m s^{-1} produisant des taux d'énergie dissipative de 10^{-1} à $10^{-2}\text{ cm}^2\text{ s}^{-3}$ dans les 25 premiers mètres de la colonne d'eau sont suffisants pour détruire les agrégats (Alldredge *et al.* 1990). De plus, l'intensité de turbulence requise pour fragmenter les agrégats augmente exponentiellement avec la diminution de la taille des agrégats (Alldredge *et al.* 1990). Les TEP étant de taille inférieure à la neige marine, elles ne sont probablement pas soumises à des processus de désagrégation. La diminution de la contribution des TEP $> 28\text{ }\mu\text{m}$ en fin d'expérience dans T2 et T4 pourrait être davantage liée à la communauté phytoplanctonique à l'origine des précurseurs des TEP, plutôt qu'à des processus physiques. En effet, *Chaetoceros sp.* est dominant dans ces mésocosmes, or des expériences en milieu contrôlé ont montré qu'en présence de *Chaetoceros gracilis*, le coefficient d'adhésion des particules diminue avec l'âge de la culture (Dam & Drapeau 1995). Bien que cette assertion reste spéculative, cela pourrait expliquer en partie pourquoi on observe moins de grandes particules en fin d'expérience dans T2 et T4.

Le taux d'agrégation des particules dépend entre autre de leur concentration (Mc Cave 1984). Les TEP étant présentes en forte abondance dans les mésocosmes enrichis, ceci leur confère une forte propension à l'agrégation, plus que dans les mésocosmes non enrichis. La turbulence semble effectivement affecter le spectre de taille des TEP en induisant la coagulation des particules. Selon la théorie de Kolmogorov, des particules de taille variant de 1 à $100\text{ }\mu\text{m}$ telles que les particules exopolymériques transparentes ne devraient pas être affectées par les courants turbulents observés en milieu naturel. En effet, pour des intensités

de turbulence variant de 10^{-6} à 10^{-9} W kg⁻¹, l'échelle de longueur à laquelle l'environnement serait soumis uniquement à des forces de viscosité, serait comprise entre 1 et 6 mm (Lazier & Mann 1989). Cependant des résultats expérimentaux ont montré que des organismes de taille 1000 fois inférieure à la micro-échelle de Kolmogorov pouvaient être influencés par la turbulence, probablement par les mouvements de cisaillement en résultant (Peters & Marrasé 2000). Par exemple, les fluctuations de vitesse de l'écoulement turbulent contribuent au déplacement relatif des particules organiques et augmentent leur taux de rencontre, processus impliqué dans la formation de la neige marine (Jackson 1990). Notre étude montre que les TEP seraient également influencées par la turbulence malgré leur taille inférieure à l'échelle de Kolmogorov. On suppose que plus les TEP coaguleront, plus elles deviendront grandes, et davantage elles seront affectées par les mouvements turbulents. Stoderegger & Herndl (1999) ont également montré que des colloïdes nouvellement formés, originaires de bactéries pouvaient coaguler sous l'effet de la turbulence pour former des TEP.

Les TEP sont souvent responsables de la sédimentation des floraisons phytoplanctoniques (Logan *et al.* 1995, Passow *et al.* 2001). Les TEP affectent le flux vertical de matière organique particulaire de deux façons : d'une part, elles augmentent la formation des agrégats, dû à leur fort coefficient d'adhésion, d'autre part, elles réduisent la vitesse de sédimentation des agrégats en diminuant la densité totale du matériel sédimentant (Engel & Shartau 1999). Ces deux processus antagonistes difficiles à déterminer, contrôlent le flux vertical de matière. Nous avons vu qu'une turbulence élevée (10^{-4} cm² s⁻³ ; T4 et NT4) maintient les TEP en suspension tandis qu'une turbulence moindre (10^{-6} cm² s⁻³, T2 et NT2) n'empêche pas la sédimentation. L'hydrodynamisme du système aura donc un impact majeur sur la dynamique et le devenir du pool de TEP. Dans cette étude, la sédimentation des TEP et celle du phytoplancton ne sont pas fortement corrélées. Lors d'une étude *in situ* Passow *et al.* (2001) ont montré que seulement la moitié du flux vertical de TEP pouvait être attribuée aux flux de diatomées, indiquant que d'autres facteurs influençaient la sédimentation des TEP. Dans cette étude, les mésocosmes sont également riches en zooplancton, leur sédimentation pourrait être impliquée dans celle des TEP. De futures investigations sont nécessaires afin d'estimer le rôle des organismes de niveau trophique supérieur dans la dynamique et le devenir du pool de TEP dans ces mésocosmes.

Encadré 2 : Le processus d'agrégation des particules

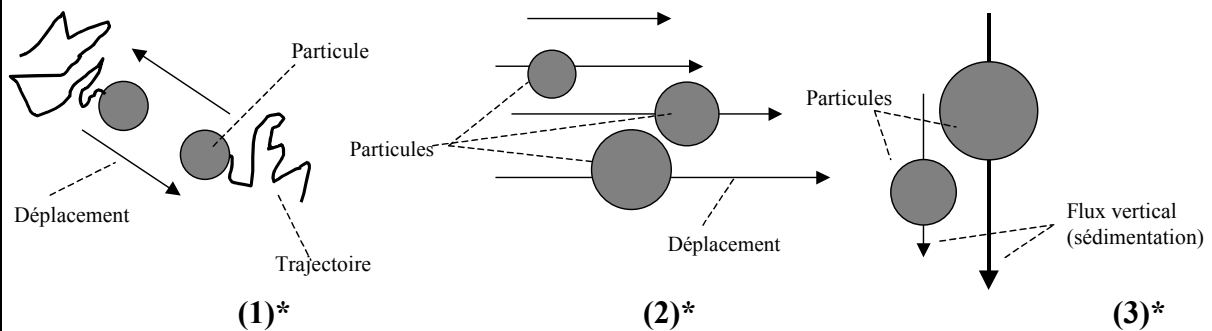
Le processus d'agrégation des particules nécessite 2 étapes : premièrement, les particules doivent se rencontrer, donnant lieu à ce que l'on appelle la **collision**. Ensuite, un agrégat sera formé si les deux particules restent liées ensemble, c'est l'**adhésion** (Vanni & Baldi 2002).

Il existe trois mécanismes entraînant la **collision** des particules dans les systèmes aquatiques (Jackson 1990) : (1) les mouvements browniens, (2) les mouvements de cisaillement (laminaires et turbulents) et (3) les mouvements liés à la sédimentation différentielle.

- (1) *Mouvements browniens* : ils sont causés par le mouvement aléatoire des molécules. Ils concernent majoritairement les particules de taille inférieure à quelques micromètres de diamètre tels que les colloïdes (Mc Cave 1984).

- (2) *Mouvements de cisaillement de l'écoulement turbulent* : ils subsistent aux échelles d'espace inférieures à l'échelle de Kolmogorov. Ils contribuent au déplacement des particules mortes et vivantes et augmentent leur taux de rencontre. Ils peuvent affecter par exemple la structure des communautés bactériennes (Moeseneder & Herndl 1995). Ce processus est également impliqué dans la formation de la neige marine (Jackson 1990) et la création d'agrégats phytoplanctoniques (Kjørboe *et al.* 1990). Les déplacements causés par ces mouvements entraînent la collision des particules si la distance les séparant est inférieure à la somme de leurs rayons (Mc Cave 1984).

- (3) *Mouvements liés à la sédimentation différentielle* : des particules sédimentant rapidement pourront intercepter des particules sédimentant plus lentement. Il y aura collision entre celles-ci, si la distance les séparant est inférieure à la somme de leurs rayons.



L'efficacité d'**adhésion** : probabilité pour que deux particules rentrant en collision, adhèrent l'une à l'autre (Mc Cave 1984, Jackson 1990).

$$\text{Efficacité d'adhésion } (\alpha) = \text{taux d'adhésion} / \text{taux de collision}$$

Le paramètre α a été déterminé de façon empirique lors d'expérimentations en chambres d'incubation munies de systèmes de cylindres rotatifs (Kjørboe *et al.* 1990). α est compris entre 0 et 1.

* schémas inspirés de Mari (1997)

5. Colonisation bactérienne des TEP

a) Colonisation en fonction de la taille des TEP

Nous avons trouvé une forte relation entre le diamètre des TEP (d) et le nombre de bactéries attachées (n). La densité bactérienne (nombre de bactéries par surface de TEP) diminue avec la taille des TEP. Schuster & Herndl (1995) ont émis l'hypothèse que les petites TEP seraient plus « agées », les bactéries auraient donc le temps de les coloniser progressivement. Cependant rien ne prouve que les petites TEP soient plus agées. En effet elles sont constamment soumises à des processus d'agrégation et de désagrégation. Il est donc difficile de valider cette hypothèse, d'autant plus que dans nos mésocosmes, les petites TEP deviennent relativement moins nombreuses avec la durée de l'expérience. Le rapport surface/volume augmente avec la diminution de la taille des particules. Les petites TEP offrent une surface d'adhésion relativement plus grande par rapport à leur taille, comparativement aux TEP plus larges. Ceci expliquerait pourquoi les petites TEP sont davantage colonisées. Mari et Kiørboe (1996) ont démontré que ce type de relation était lié à des processus physiques de coagulation, cette hypothèse impliquant que les TEP sont des particules de nature fractale. Ces résultats suggèrent donc que les TEP dans les mésocosmes sont majoritairement formées par coagulation.

b) Rôle des TEP en tant que micro-niche

Les TEP sont largement colonisées par les bactéries (80% des TEP en moyenne) ce qui confirme les études précédentes (cf références au Tableau IV-VI). On a observé de fortes corrélations entre la production bactérienne et la présence des TEP dans NT4 (Figure IV-18). Cependant, l'effet de la colonisation des agrégats sur la croissance et la production bactérienne (PB) reste controversé. Selon Alldredge *et al.* (1986), les bactéries attachées ne grandissent pas plus rapidement et leur production est égale ou inférieure aux bactéries libres mais elles sont plus grandes, suggérant une adaptation et/ou une différenciation taxonomique. Alldredge et Gotschalk (1990) ont mis en évidence une croissance bactérienne dans la neige marine trois fois plus élevée mais une production négligeable. Grossart et Simon (1998) ont trouvé une PB et un taux de croissance des bactéries liées aux agrégats, très faibles. Enfin, Ploug et Grossart (1999) ont montré que la PB est systématiquement plus élevée dans les agrégats ($> 0,7\text{mm}$). Même si la production et la croissance des bactéries colonisatrices restent mal comprises, celles-ci montrent une activité enzymatique élevée impliquant une

dissolution rapide de la fraction labile de la matière organique (Smith *et al.* 1992, Smith *et al.* 1995, Amon & Benner 1996, Grossart & Simon 1998). Passow et Azam (non publié, cités dans Passow 2002b) ont montré une dégradation rapide ($0,3 \text{ mm}^2 \text{ TEP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) des TEP nouvellement formées. Dans notre étude, les TEP sont fraîches, il est donc possible que les bactéries utilisent en partie celles-ci pour leur croissance. Les TEP sont en effet capables d'adsorber des substrats riches en azote tels que des acides-aminés (Decho 1990, Schuster *et al.* 1998) et sont riches en carbone. Considérant le fort taux de colonisation et la corrélation entre ces particules et la production bactérienne dans NT4, on peut supposer que les TEP jouent un rôle dans le recyclage du carbone par les bactéries.

c) Effet des conditions trophiques et de la turbulence sur la colonisation bactérienne

Les pourcentages de bactéries attachées aux TEP observés dans l'eau du fjord (de 4% à 36%) sont proches de ceux observés dans les stations côtières de Californie ou du Kattegat. Il semble qu'en milieu lacustre et en Mer Adriatique, les pourcentages observés soient relativement plus faibles (Tableau IV-VI). Cette différence serait-elle due aux conditions trophiques ou à l'hydrodynamisme des systèmes étudiés ?

Peu d'études font référence à l'effet des conditions trophiques sur la colonisation bactérienne des TEP. Seuls Schuster et Herndl (1995) ont montré que la fraction de bactéries liées aux TEP est supérieure en une station eutrophique en Mer Adriatique comparativement à des stations moins riches en sels nutritifs. Passow (2002b) montre qu'il n'existe pas de tendance générale entre la colonisation bactérienne des TEP et les conditions trophiques du milieu. Notre étude le corrobore. En effet, dans nos mésocosmes, un apport en sels nutritifs n'a pas d'effet significatif sur la colonisation bactérienne des TEP. Pourtant, la nature des TEP est différentes selon les conditions trophiques. Nous avons montré au chapitre II qu'en conditions limitantes en azote, les TEP étaient relativement plus riches en carbone. Si la colonisation bactérienne était gouvernée principalement par des phénomènes chimiotactiques, cette étude révélerait un effet des conditions trophiques. Or seule la turbulence, semble avoir un effet sur la colonisation bactérienne. Même s'il existe un comportement chimiotactique des bactéries vers les TEP, celui-ci semble être masqué par l'effet de la turbulence. Ceci suggère que les courants turbulents accélèrent les taux de rencontre entre TEP et bactéries. Les TEP ont un coefficient d'adhésion élevé (Dam & Drapeau 1995). Une bactérie rencontrant une telle particule se trouve dans un milieu visqueux et collant et sera engluée dans cette matrice

de matière organique. Dans de telles conditions, le terme de colonisation ne devient plus approprié, il s'agit davantage de collisions suivies d'un attachement.

Tableau IV-VI : Pourcentages de bactéries totales attachées aux TEP estimées lors d'études précédentes et dans cette étude.

% de bactéries totales liées aux TEP	Caractéristiques du milieu	Références
24-68%	Station côtière (Californie)	Allredge <i>et al.</i> (1993)
2-25% Max :89%	Station côtière (Californie) Max durant floraison de dinoflagellés	Passow & Allredge (1994)
0,57% 1,87% 4,92% Max : 26,3%	Mer Adriatique : Station oligotrophique Station mésotrophique Station eutrophique Max à 5m de profondeur à la station eutrophique	Schuster & Herndl (1995)
0,5 - 20%	Station côtière eutrophique Kattegat (Danemark)	Mari & Kjørboe 1996
0,3% 0,8%	Milieu lacustre (France) Lac Pavin (oligomésotrophique) Lac Aydat (eutrophique)	Carrias <i>et al.</i> 2002
4-36% 17,5-53%	Fjord Norvégien (eutrophique) Mésocosme (floraison - jour 5)	Cette étude

Cette étude montre qu'en conditions de forte turbulence, les liens physiques entre TEP et bactéries sont stimulés. Ceci pourrait expliquer pourquoi les études précédentes révèlent des pourcentages de bactéries attachées relativement élevés en milieu côtier comparativement à des milieux plus calmes tels qu'en milieu lacustre ou en milieu océanique. Un événement climatique important aura sans doute des répercussions sur l'agrégation des bactéries aux particules organiques, et en conséquence sur les flux de carbone via le réseau trophique microbien.

6. Conclusion

➔ Origine et formation

Nos résultats confirment le rôle majeur des diatomées, en particulier de *Skeletonema costatum* et de *Thalassiosira sp.* dans la formation des particules exopolymériques transparentes. Plus que la biomasse, c'est l'état physiologique de la communauté

phytoplanctonique qui contrôle cette formation. Cette étude confirme également le rôle des conditions trophiques sur l'exsudation des précurseurs des TEP : en conditions limitantes en azote, la formation des précurseurs est intense. La turbulence n'accélère pas la production de TEP, cependant elle favorise le développement de la communauté de diatomées, à l'origine de la formation de ces particules. L'effet de la turbulence sur la production des TEP est donc indirect.

➡ Conséquences sur la dynamique du carbone

Le découplage des dynamiques du carbone et de l'azote après la floraison phytoplanctonique peut être attribué en grande partie à la formation des particules exopolymériques transparentes. Cette étude en milieu contrôlé confirme nos résultats observés *in situ* en Méditerranée Nord-Occidentale (chapitre III). Ce processus est observé quelle que soit l'intensité de turbulence.

➡ Effet de la turbulence sur l'agrégation et la sédimentation des TEP

L'influence de la turbulence sur les TEP, est différente selon les conditions trophiques ; elle est observée lorsque le milieu est riche en matériel organique. Même à des échelles inférieures à l'échelle de Kolmogorov, les TEP semblent influencées par les courants turbulents. Une turbulence induite par un événement climatique fort ($10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-3}$) pourra maintenir le pool de TEP en suspension et intensifier la formation d'agrégats en augmentant les taux de collision et de coagulation des particules. Un vent léger ($10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-3}$) n'empêchera pas la sédimentation des TEP si celles-ci ont été produites en forte abondance. Dans ces conditions, les TEP participeront de façon importante au flux de matériel organique vers les couches profondes. En milieu naturel, selon les conditions trophiques, l'hydrodynamisme du système pourra contrôler l'agrégation, l'accumulation et /ou la sédimentation des TEP.

➡ Effet de la turbulence sur la colonisation bactérienne

Les TEP sont largement colonisées par les bactéries, elles constituent une véritable micro-niche physique. Les TEP participent de façon non négligeable à l'hétérogénéité du milieu pélagique. Dans cette étude, l'effet de la turbulence sur la colonisation bactérienne semble masquer les processus chimiotactiques en augmentant les taux de collision entre bactéries et particules. De forts courants turbulents pourront augmenter les contacts TEP/bactéries et modifier ainsi les flux de carbone via le réseau trophique microbien.

Chapitre V

Composition élémentaire des Particules Exopolymériques Transparentes en fonction des conditions trophiques.

A. Introduction	129
B. Matériels & Méthodes	131
1. <i>Prélèvement et préparation des échantillons</i>	131
2. <i>Composition élémentaire des particules organiques non vivantes</i>	133
a) Principe du MET-rayons X.....	133
b) Analyse de la matière organique particulaire non vivante.....	133
3. <i>Rapports C/N, C/P et N/P</i>	134
4. <i>Estimation de la concentration en éléments liés aux TEP.</i>	135
a) Dans l'eau de mer naturelle (jour 0).....	135
b) Le cas particulier du carbone.....	135
C. Résultats.....	137
1. <i>Composition élémentaire des particules organiques</i>	137
2. <i>Rapports C/N, C/P et N/P des particules organiques</i>	141
3. <i>Contribution des TEP au cycle biogéochimique des éléments</i>	145
a) Dans l'eau de mer naturelle	145
b) Cas particulier du carbone.....	146
D. Discussion.....	148
1. <i>La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X : une nouvelle approche pour l'étude des Particules Exopolymériques Transparentes</i>	148
2. <i>Contribution des TEP aux cycles du carbone, de l'azote et du phosphore</i>	149
a) Rôle des TEP dans la surconsommation de CID	149
b) Régulation du rapport C/N des TEP	150
c) Origines de l'azote et du phosphore des TEP	151
3. <i>Contribution des TEP dans le cycle des métaux-traces</i>	152
4. <i>Conclusion</i>	154

A. INTRODUCTION

Afin de comprendre le fonctionnement d'un écosystème dans sa globalité, il est nécessaire de quantifier les différents compartiments qui le composent, ainsi que les flux de matière et d'énergie circulant en son sein. L'une des approches couramment utilisée est basée sur l'estimation d'éléments biogéniques majeurs tels que le carbone, le phosphore et l'azote. La composition élémentaire des composants du système doit donc être déterminée. Dans le milieu marin, l'utilisation du rapport de Redfield (Redfield *et al.* 1963) pour le calcul des flux et des stocks de matière organique dans les modèles biologiques est un outil essentiel car il décrit une covariation des éléments carbone, azote et phosphore selon un rapport constant (106:16:1). Le rapport de Redfield implique une interaction réciproque entre la composition élémentaire du biota marin et de ses ressources nutritives. Les mesures existantes sont cependant basées principalement sur des mesures globales et ne sont donc pas toujours appropriées à l'échelle de l'individu, de l'espèce et même du groupe trophique (Heldal *et al.* 1996). De plus en plus d'études montrent que ce rapport n'est pas universel. Le rapport C/N/P du phytoplancton et des bactéries par exemple, varie en fonction de leur phase de croissance et des conditions trophiques (Sciandra *et al.* 1997, Vrede *et al.* 2002). La matière organique dissoute peut également avoir un rapport C/N largement supérieur au rapport de Redfield (Kähler & Koeve 2001). Ainsi, est-il nécessaire d'intégrer ces déviations aux modèles théoriques dans l'estimation des différents composants de l'écosystème marin.

Comme nous l'avons vu au chapitre II, les TEP ne combinent pas le carbone et l'azote selon le rapport de Redfield. Les TEP sont déterminées par coloration au bleu Alcian ; elles sont donc, par définition, composées majoritairement d'acides polysaccharidiques. Cependant leur nature reste encore mal connue. En effet, leur caractère flexible et fragile rend délicates les analyses chimiques, de plus il est difficile de les isoler des autres particules (détritiques ou biogéniques) en suspension. Les recherches se concentrent actuellement sur leur composition en carbone. Cependant les méthodes d'estimation du carbone lié aux TEP restent encore prédictives. En effet, seules des méthodes indirectes via l'utilisation de facteurs de conversion sont utilisées (Mari 1999, Engel & Passow 2001).

Nous explorons ici une approche nouvelle, basée sur l'utilisation de la microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X (MET-rayons X) pour déterminer la composition élémentaire des particules organiques individuellement. Cette méthode a été auparavant utilisée pour la caractérisation chimique des bactéries (Norland *et*

al. 1995, Heldal *et al.* 1996, Heldal *et al.* 2002, Vrede *et al.* 2002), des colloïdes (Grout *et al.* 2001), de la neige marine (Leppard *et al.* 1996), des particules jaunes après coloration au DAPI (« DYP », Mostajir *et al.* 1997), mais jamais des particules exopolymériques transparentes.

Nous orienterons cette étude vers la détermination d'éléments clefs dans les processus trophiques, tels que le carbone (C), le phosphore (P) et l'azote (N). De plus, les TEP sont formées par l'assemblage spontané de polymères fibrillaires, promu par des ponts cationiques bivalents, en particulier de calcium et de magnésium (Alldredge *et al.* 1993, Chin *et al.* 1998). Ces éléments (Ca et Mg), permettant de maintenir l'intégrité structurale des TEP feront également l'objet d'analyses. Enfin, jusqu'à présent, très peu de travaux font état du rôle des TEP dans le cycle des éléments-traces. Seul Niven *et al.* (1997) ont montré que les TEP étaient capables d'adsorber le thorium. Pourtant, le cycle biogéochimique des métaux dépend largement de la présence des polysaccharides, car il existe une forte affinité entre ces éléments-traces et les exopolymères. Entre 40 et 90% des composés traces peuvent être adsorbés sur les colloïdes marins (Buffle *et al.* 1998). Nous proposons d'établir une première approche sur la fonction des TEP en tant que ligand pour deux métaux fortement impliqués dans les processus biologiques : le manganèse (Mn) et le fer (Fe).

Les principaux objectifs de cette étude sont donc :

- d'explorer une nouvelle approche pour la détermination de la composition élémentaire des TEP
- de déterminer l'influence des conditions trophiques sur les rapports C/N, C/P et N/P des TEP
- de déterminer l'importance des TEP en tant que réservoir de carbone, d'azote et de phosphore
- d'estimer le rôle des TEP en tant que ligand de métaux-traces (Fer et Manganèse)

B. MATERIELS & METHODES**1. Prélèvement et préparation des échantillons**

Les échantillons d'eau analysés proviennent des mésocosmes non soumis à la turbulence, non enrichis (T0) et enrichis en sels nutritifs (NT0), décrits au chapitre précédent. Le Tableau V-I récapitule les conditions trophiques dans ces deux traitements.

Tableau V-I : Concentrations en nitrates, phosphates et silicates (μM) dans les mésocosmes échantillonnés, lors des conditions initiales (jour 0) et après éventuel enrichissement en sels nutritifs (jour 1).

Mésocosme T0				Mésocosme NT0		
	Nitrate	Phosphate	Silicate	Nitrate	Phosphate	Silicate
Jour 0	= eau de mer naturelle					
	0,36	0,22	1,51	0,52	0,17	1,53
Jour 1	Pas d'enrichissement en sels nutritifs			Enrichissement en sels nutritifs		
	0,00	0,16	1,60	12,48	1,21	33,19

Du jour 0 au jour 7 de l'expérimentation, 10 ml d'eau de mer ont été prélevés dans chaque mésocosme (T0 et NT0). Les échantillons ont été préparés frais. Une centrifugation à 10 000 tours par minute durant 30 mn (SW 41 rotor, Beckman ultra-centrifuge, 12 000g), à 20°C, permet de récolter les particules (non fixées, ni marquées) présentes en suspension dans les échantillons sur des grilles d'aluminium (G242A-AGAR™ - square mesh - 3,05 mm). Elles sont ensuite séchées à l'air libre et préservées à l'abri de l'humidité en vue des analyses ultérieures. Ces grilles ont été préalablement recouvertes d'un film de carbone Formvar™ afin de permettre la conduction lors de l'analyse au microscope électronique à transmission (MET).

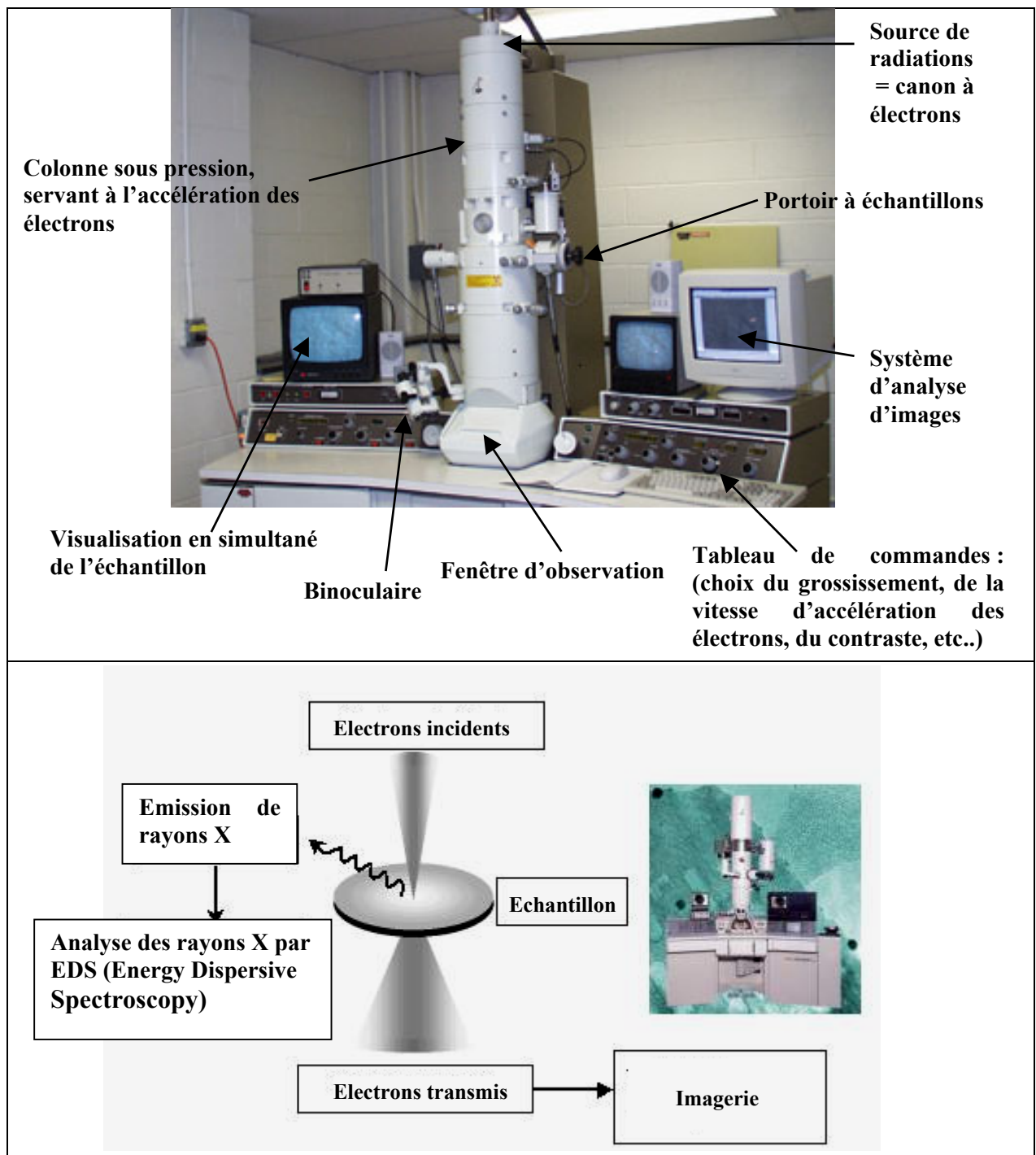


Figure V-1: Photographie d'un microscope électronique à transmission couplé à un micro-analyseur à rayons-X (haut). Schéma du principe de fonctionnement du MET-rayons X (bas). (Photo issue du site <http://lifesci.rutgers.edu/~cbn/emlab/jeol.html>. Schéma tiré du site <http://catalyse.univ-lyon1.fr/smic1.html>).

2. Composition élémentaire des particules organiques non vivantes

La composition élémentaire des particules organiques non vivantes a été estimée au moyen d'un microscope électronique à transmission couplé à un micro-analyseur à rayons X (MET-rayons X). Cette méthode permet de quantifier de façon directe les éléments de chaque particule, individuellement.

a) Principe du MET-rayons X

Lorsque des électrons accélérés interagissent avec la matière, des photons de forte énergie (rayons X) sont émis (Figure V-1). L'analyse de l'intensité et de la nature de ces rayons X permet de déterminer la composition élémentaire de la matière ciblée. Ce microscope (MET philips™ CM 200) émet une gerbe d'électrons (tension d'accélération sous vide de 120 kV) condensée sur une partie de l'échantillon (de l'ordre de quelques nm à un dixième de mm). Une lentille magnétique permet de former une image de l'objet avec les électrons qui interagissent fortement avec la matière traversée. Une fois l'image acquise, une sonde (EDAX™-DX-4 EDS) permet de cibler de façon précise la zone d'intérêt et d'analyser les rayons X émis par spectrométrie de perte d'énergie. Afin de soustraire le bruit de fond, une zone libre, à proximité de la particule, est analysée dans les mêmes conditions. On obtient alors des spectres de perte d'énergie accumulés pendant 100 s. Dix-neuf éléments majeurs du carbone au cuivre sont détectés. Les spectres sont transférés sur un ordinateur couplé à un système d'exploitation des données numériques. Les détails de la programmation et du calibrage de ce système ont été développés à l'Université de Bergen (Heldal *et al.* 1985, Norland *et al.* 1995).

b) Analyse de la matière organique particulaire non vivante

Nous focaliserons notre analyse sur la matière organique non vivante, fibrillaire ou diffuse, de taille particulaire. Les particules détritiques inorganiques sont facilement détectables par leur forte densité, et leur composition riche en O, Si, Al, K, Ca, Mg et Fe et leur pauvreté en C, N et P (Mostajir *et al.* 1997). Celles-ci seront donc exclues de nos analyses. Les particules organiques vivantes telles les bactéries et les cellules phytoplanctoniques sont reconnaissables à leur parois et leur forme caractéristique ; elles ne feront également pas l'objet d'analyses.

Nous avons finalement étudié la composition élémentaire de 124 particules issues du mésocosme non enrichi (T0), et de 122 particules issues du mésocosme enrichi en sels nutritifs (NT0), durant les 7 premiers jours de l'expérimentation (Tableau V-II). Les signaux de sodium (Na) et de chlorure (Cl) considérés comme des contaminants résiduels issus de l'eau de mer, ainsi que celui de l'aluminium reflétant l'arrière-plan de la grille ont été éliminés. Notre étude portera sur l'analyse du carbone (C), de l'azote (N), du magnésium (Mg), du phosphore (P), du calcium (Ca), du manganèse (Mn) et du fer (Fe). Les résultats seront fournis en masse d'éléments par surface de particules ($\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$).

Tableau V-II : Nombre de particules analysées au cours de cette expérience.

Nombre de particules analysées						
	Jour 0	Jour 1	Jour 3	Jour 5	Jour 7	total
Sans addition de sels nutritifs (T0)	8	45	10	39	22	124
Avec addition de sels nutritifs (NT0)	48	35	17	5	17	122

3. Rapports C/N, C/P et N/P

Les rapports C/N, C/P et N/P des particules analysées ont été déterminés à partir des pentes des droites de régression opposant la quantité d'un élément y ($\text{fmol } \mu\text{m}^{-2}$) d'une particule individuelle, à celle d'un élément x ($\text{fmol } \mu\text{m}^{-2}$) de la même particule.

$$\text{Elément}_y = a \times \text{Elément}_x + b \quad (11)$$

avec *a*, la pente de la droite de régression et *b* l'ordonnée à l'origine. La pente *a* désigne donc le rapport molaire y/x .

Pour chaque traitement (T0 et NT0) et pour chaque jour, nous avons testé la signification des droites de régression (test de signification du *r* de Pearson ; Sherrer 1984). L'effet du traitement (avec ou sans sels nutritifs) sur le rapport C/N des particules, a été testé par une analyse de covariance (ANCOVA) pour deux échantillons indépendants. Avant de décrire les résultats des ANCOVA nous nous sommes assurés de la normalité des distributions et de l'homogénéité des régressions, conditions nécessaires à l'application d'un tel test.

4. Estimation de la concentration en éléments liés aux TEP.

a) Dans l'eau de mer naturelle (jour 0)

Dans les mésocosmes, nous connaissons la concentration en particules exopolymériques transparentes (TEP) ainsi que leur diamètre de sphère équivalente (D_{se} , μm) pour chaque classe de taille (chapitre IV). Nous pouvons alors en déduire la surface sphérique totale des TEP dans les mésocosmes ($\mu\text{m}^2 \text{ l}^{-1}$). Les données issues du MET fournissent la masse en éléments (C, N, P, Mg, Ca, Mn et Fe) par surface de particules analysées ($\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$). Si l'on suppose que les particules analysées au MET-rayons X sont constituées majoritairement de TEP, nous pourrions alors estimer la contribution des TEP au pool des éléments dans l'eau de mer (en fg l^{-1}).

$$\text{Masse}_{\text{élément}} \text{ Surface}^{-1} \times \text{Surface}_{\text{TEP}} \text{ Volume}^{-1} = \text{Masse}_{\text{élément-TEP}} \text{ Volume}^{-1} \quad (12)$$

La surface sphérique des TEP par unité de volume (S , $\mu\text{m}^2 \text{ l}^{-1}$) dans T0 et dans NT0 est calculée à partir de leur diamètre de sphère équivalente (D_{se}) selon l'équation :

$$S = 4\pi R^2 = 4\pi (D_{se}/2)^2 \quad (13)$$

Au final, les résultats seront fournis en $\mu\text{mol l}^{-1}$ ou en nmol l^{-1} . Nous avons effectué cette estimation sur les particules issues des mésocosmes T0 et NT0 lors des conditions initiales (jour 0), correspondant à l'eau de mer naturelle issue du fjord. Les résultats sont variables selon les particules étudiées, nous présenterons donc les minima et les maxima.

b) Le cas particulier du carbone

Comme nous l'avons vu au chapitre III, la détermination de la concentration en carbone lié aux TEP (TEP-C), basée sur la formule de conversion établie par Mari (1999), semble parfois surestimer les valeurs. Nous comparerons dans l'ensemble des mésocosmes, les concentrations en TEP-C, calculées par le biais de cette formule, à celles observées directement grâce au MET-rayons X.

Rappelons le détail de l'équation permettant d'estimer le TEP-C ($\mu\text{mol C l}^{-1}$).

$$\text{TEP-C} = 0,25 \sum_i n_i r_i^{2,55} \quad (14)$$

où n_i est la concentration en particules dans la classe de taille i et r_i est le rayon (μm) des TEP dans cette même classe de taille.

Nous comparerons également ces valeurs aux concentrations de carbone organique particulaire (COP) déterminées par filtration sur GF/F et analyse au CHN (Leco 900™).

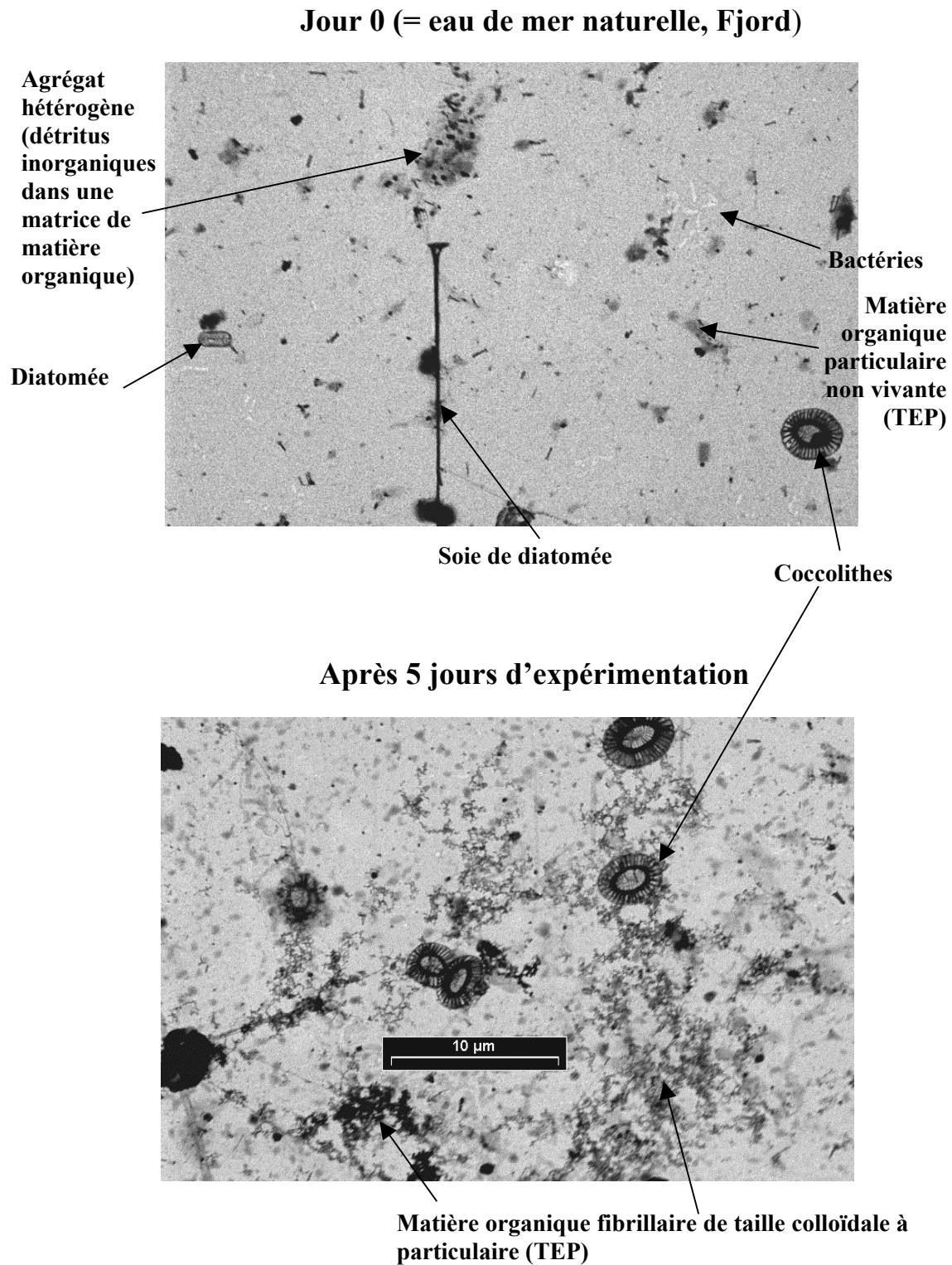


Figure V-2 : Micro-photographies de l'eau de mer échantillonnée dans les mésocosmes, visualisée au microscope électronique à transmission (MET). haut : eau de mer naturelle. bas : eau de mer enrichie en sels nutritifs, après 5 jours d'expérience. L'échelle est identique pour les deux photos.

C. RESULTATS

1. Composition élémentaire des particules organiques

L'eau de mer naturelle prélevée dans le fjord est constituée d'éléments organiques vivants tels que des bactéries, des espèces phytoplanctoniques (en majorité des coccolithophoridés et des diatomées) et des agrégats organiques non vivants de taille variable (quelques μm à $10\ \mu\text{m}$). On observe également des détritits inorganiques, parfois englobés dans une matrice de matière organique (Figure V-2 haut). Après 5 jours d'expérimentation dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, on observe une augmentation du nombre et de la taille de ces agrégats (taille souvent supérieure à $10\ \mu\text{m}$, Figure V-2 bas). Ceux-ci présentent une texture plus fibrillaire et constituent une réelle matrice organique dans laquelle les cellules phytoplanctoniques et les détritits sont englobés. L'objet de cette étude portera sur ces agrégats organiques non vivants que nous avons assimilé aux particules exopolymériques transparentes.

La Figure V-3 offre une vision globale de la composition élémentaire des particules organiques (valeurs moyennes). Cependant, les valeurs étant variables d'une particule à l'autre nous avons présenté les gammes de variation (minima et maxima) associées à leurs moyennes (Figure V-4 et Figure V-5). Lors des conditions initiales (avant traitement), les particules organiques sont composées majoritairement de carbone (de $1,39$ à $60,83\ \text{fg C}\ \mu\text{m}^{-2}$) et d'azote (de $0,22$ à $6,42\ \text{fg N}\ \mu\text{m}^{-2}$). Leur composition en magnésium et en calcium peut atteindre respectivement $2,91\ \text{fg Mg}\ \mu\text{m}^{-2}$ et $1,87\ \text{fg Ca}\ \mu\text{m}^{-2}$. On trouve également du phosphore (de $0,03$ à $0,88\ \text{fg P}\ \mu\text{m}^{-2}$). Enfin, ces particules contiennent des métaux traces tels que du manganèse (de $0,00$ à $0,07\ \text{fg Mn}\ \mu\text{m}^{-2}$) et du fer (de $0,00$ à $0,78\ \text{fg Fe}\ \mu\text{m}^{-2}$).

Les variations de la composition élémentaire des particules en fonction de la durée de l'expérience, sont différentes entre T0 et NT0. Globalement dans T0, les particules deviennent plus riches en C, N et P du jour 3 au jour 7 (Figure V-4). Leur densité augmente donc avec la durée de l'expérience. Dans NT0, la composition moyenne en azote reste constante du jour 3 au jour 7, tandis que la composition en carbone et en phosphore est davantage soumise à des fluctuations.

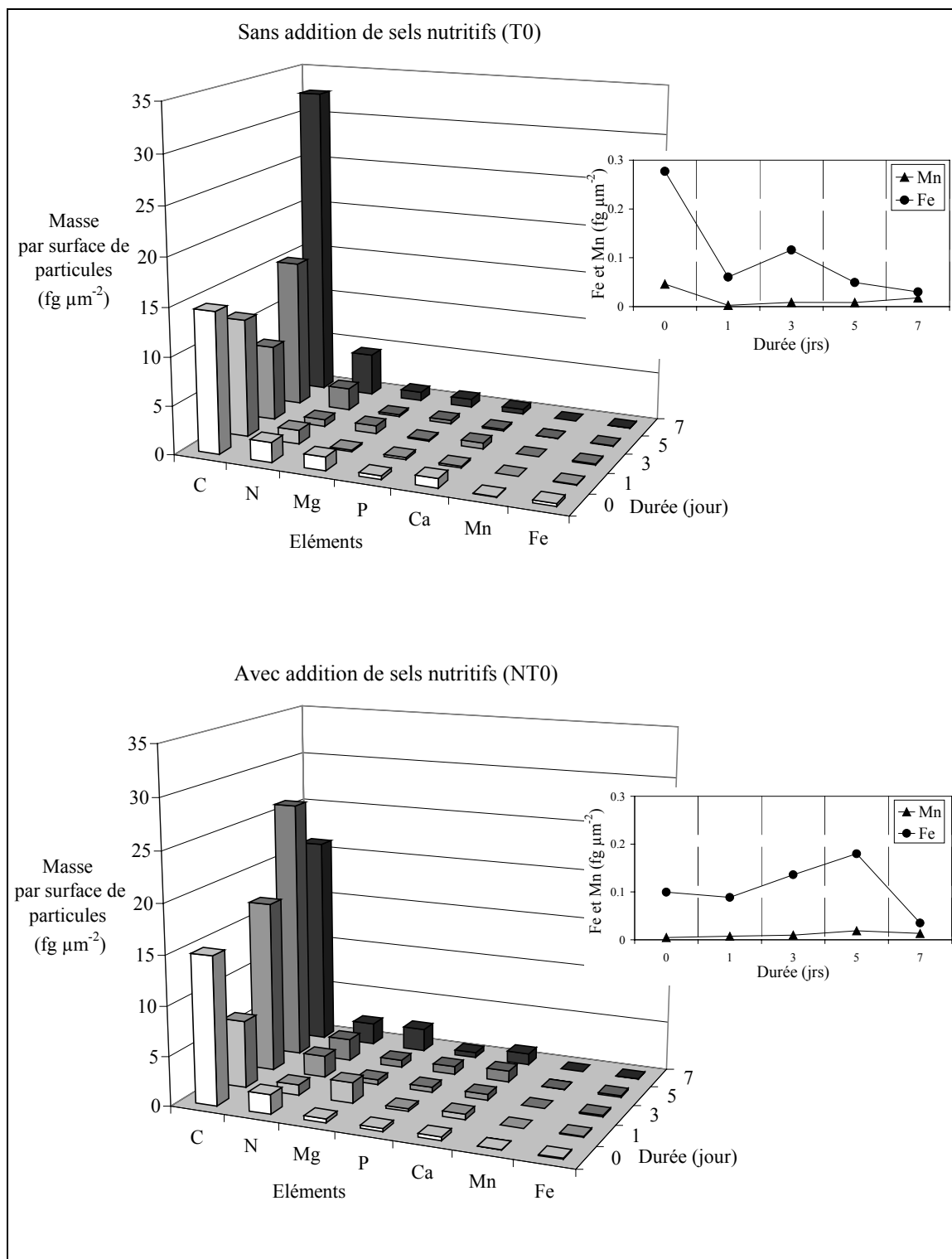


Figure V-3 : Composition élémentaire (en $\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$; valeurs moyennes) des particules analysées au microscope électronique à transmission dans les mésocosmes non enrichis (haut) et enrichis en sels nutritifs (bas) durant les 7 jours d'expérience. Les graphes à droite illustrent les variations du Fer et du Mn selon les mêmes conditions, après changement d'échelle afin de faciliter l'observation.

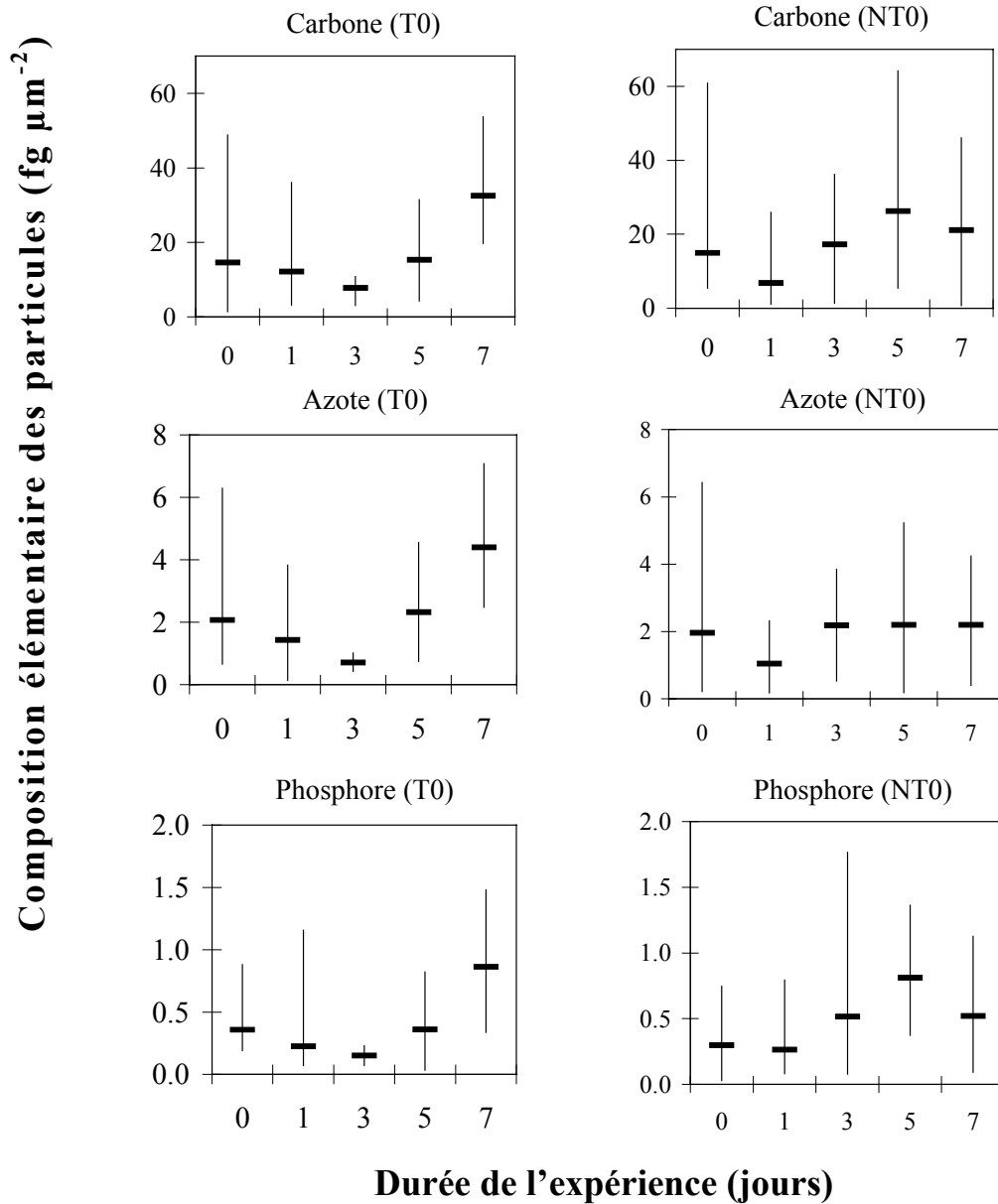


Figure V-4 : Compositions élémentaires en C, N et P des particules organiques analysées au MET-rayons X ($\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$), dans T0 (gauche) et dans NT0 (droite). Les barres verticales représentent les gammes de variation, les barres horizontales illustrent la valeur moyenne. Le nombre de particules analysées est récapitulé au tableau V-II.

Les particules issues des mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT0) deviennent plus riches en magnésium et en calcium à partir du jour 5, comparativement aux particules issues de T0 (Figure V-5). La composition en éléments-traces fluctue également avec le temps dans T0 et NT0 sans que l'on puisse mettre en évidence de différences entre les deux traitements.

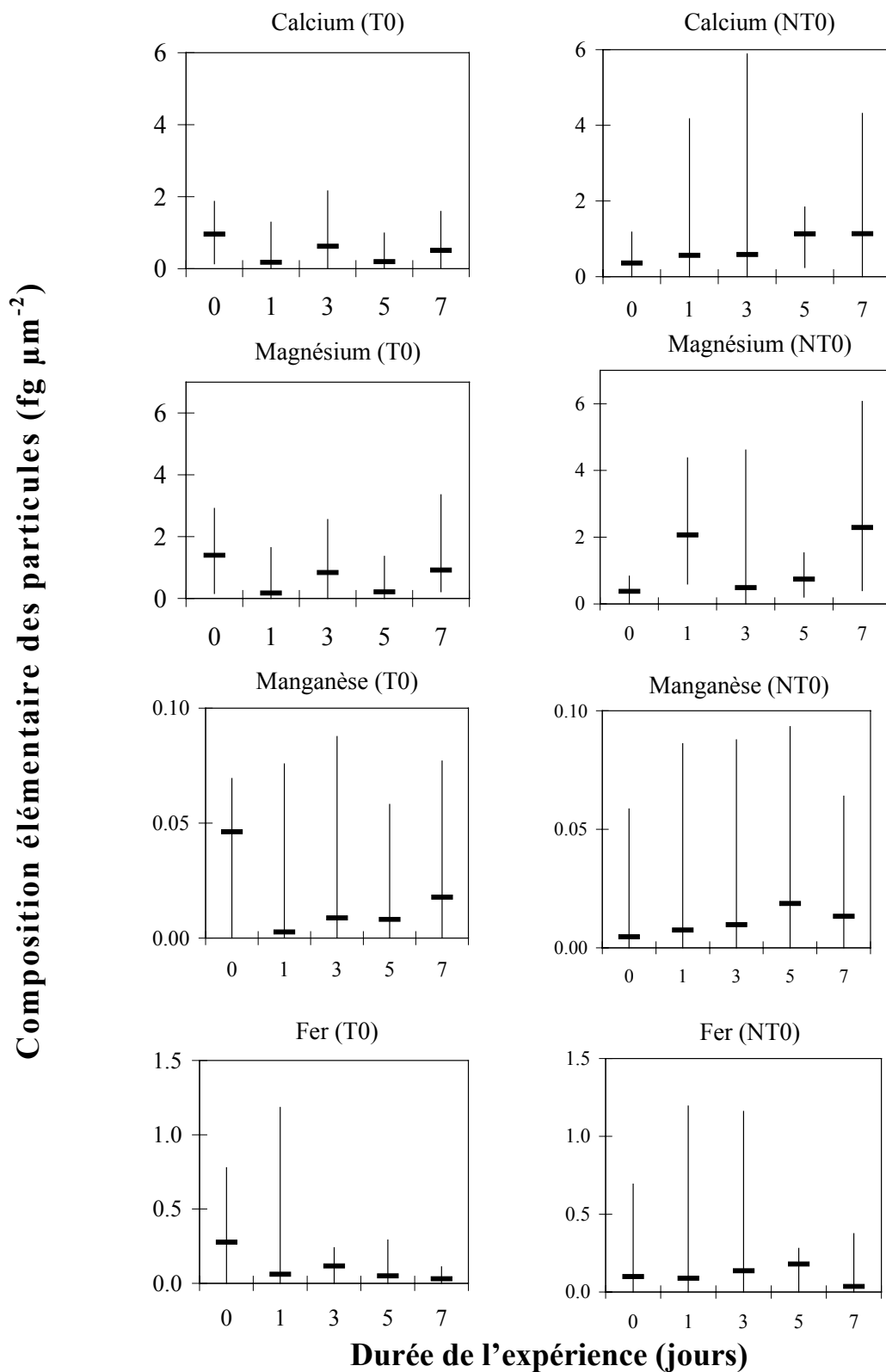


Figure V-5 : Composition élémentaire en Ca, Mg, Mn et Fe, des particules organiques analysées au MET-rayons X ($\text{fg } \mu\text{m}^{-2}$), issues de T0 (gauche) et de NT0 (droite). Les barres verticales représentent les gammes de variation, les barres horizontales illustrent les valeurs moyennes.

2. Rapports C/N, C/P et N/P des particules organiques

La composition en azote des particules est significativement corrélée à leur composition en carbone quel que soit le traitement et durant la totalité de l'expérience (Figure V-6). Le rapport molaire C/N des particules est de 7,8 en moyenne lors des conditions initiales, suggérant une relative richesse en carbone dans le milieu naturel. L'enrichissement en sels nutritifs a un effet significatif sur le rapport C/N des particules (Tableau V-III). Dans le mésocosme non enrichi (T0), le rapport C/N augmente jusqu'au jour 3 pour atteindre des valeurs de 13,8. A partir du jour 5, le rapport diminue et reste stable jusqu'au jour 7 (jour 5 = jour 7, ANCOVA, $p > 0,05$). Il est alors proche du rapport de Redfield (6,7 en moyenne). Il semble qu'il existe un processus régulant la composition en azote par rapport à celle du carbone. Avec enrichissement en sels nutritifs (NT0), le rapport C/N des particules augmente également mais plus tardivement pour atteindre des valeurs maximales (11,2) au jour 5. Or dans T0, les conditions en azote deviennent limitantes pour le phytoplancton dès le premier jour, tandis que dans NT0, les concentrations en nitrates sont épuisées plus tardivement, à partir du jour 3 (chapitre précédent).

Tableau V-III : Effet d'un apport en sels nutritifs sur le rapport C/N des particules analysées. Résultats de l'ANCOVA pour 2 échantillons indépendants (T0 = sans apport de sels nutritifs, NT0 = avec apport de sels nutritifs, ddl = degré de liberté, $k = 2$, n est l'effectif total).

Jours	F	ddl ($k-1$; $n-k-1$)	p	bilan
0	0,33	1 ; 53	0,57	T0 = NT0
1	Les régressions ne sont pas homogènes ($p < 0,001$)			ANCOVA impossible
3	4,65	1 ; 24	$< 0,05$	T0 \neq NT0 *
5	16,69	1 ; 41	$< 0,001$	T0 \neq NT0 ***
7	19,16	1 ; 36	$< 0,001$	T0 \neq NT0 ***

Dans le milieu naturel (jour 0), le carbone et le phosphore des particules ne sont pas corrélés de façon significatives (Figure V-7). Globalement, la composition en carbone et en phosphore des particules est variable mais toujours inférieure à 106 (Rapport C/P de Redfield). Ces particules sont donc relativement riches en phosphore par rapport à leur teneur en carbone.

Carbone versus Azote

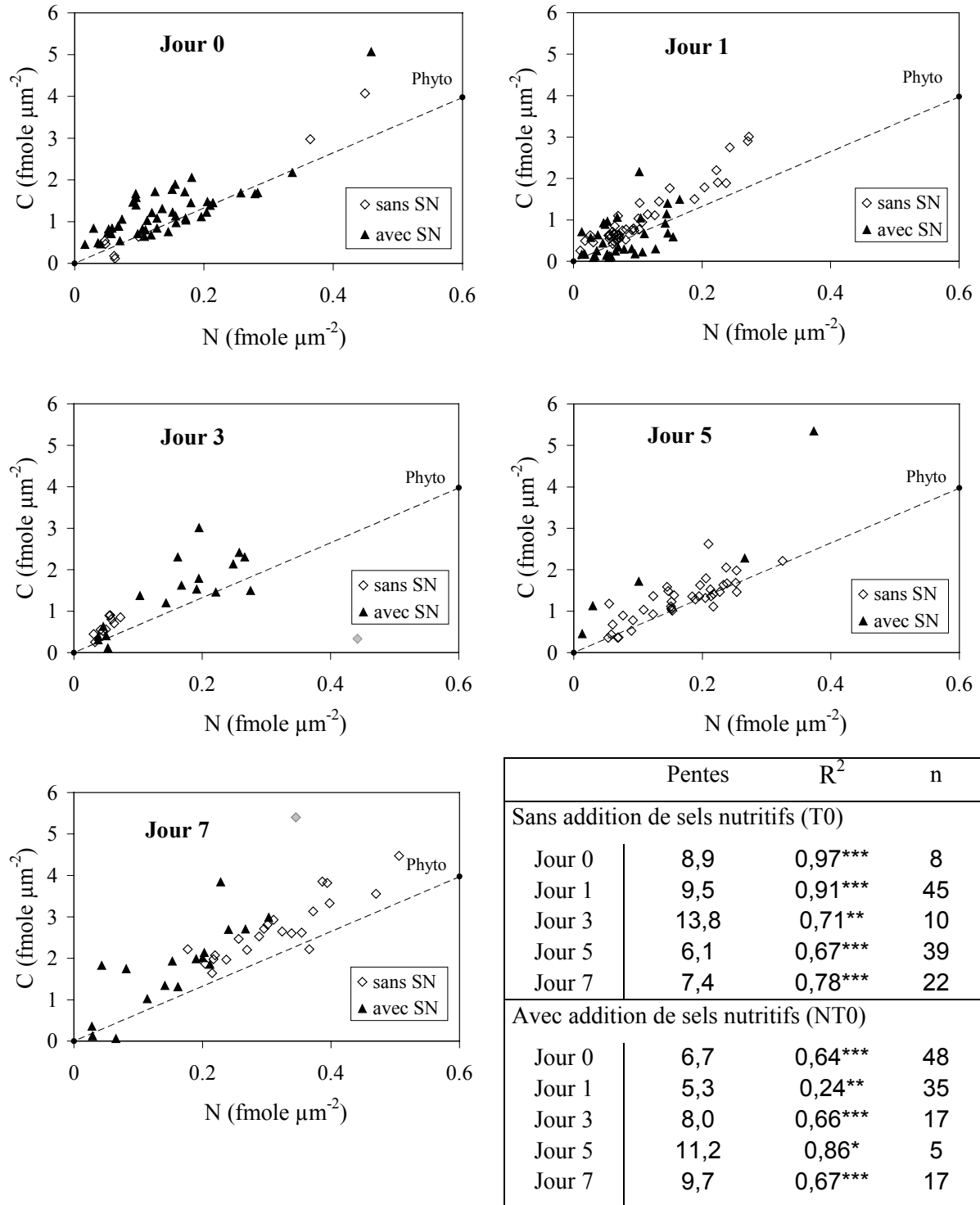


Figure V-6 : Composition élémentaire (C versus N) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation. Chaque point représente une particule individuelle. La droite discontinue illustre la droite théorique pour le phytoplancton ($C/N = 106/16$). Le tableau récapitule les pentes des droites de régression associées à leur coefficient de détermination (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$). Les pentes nous renseignent sur les rapports molaires C/N des particules.**

Carbone versus Phosphore

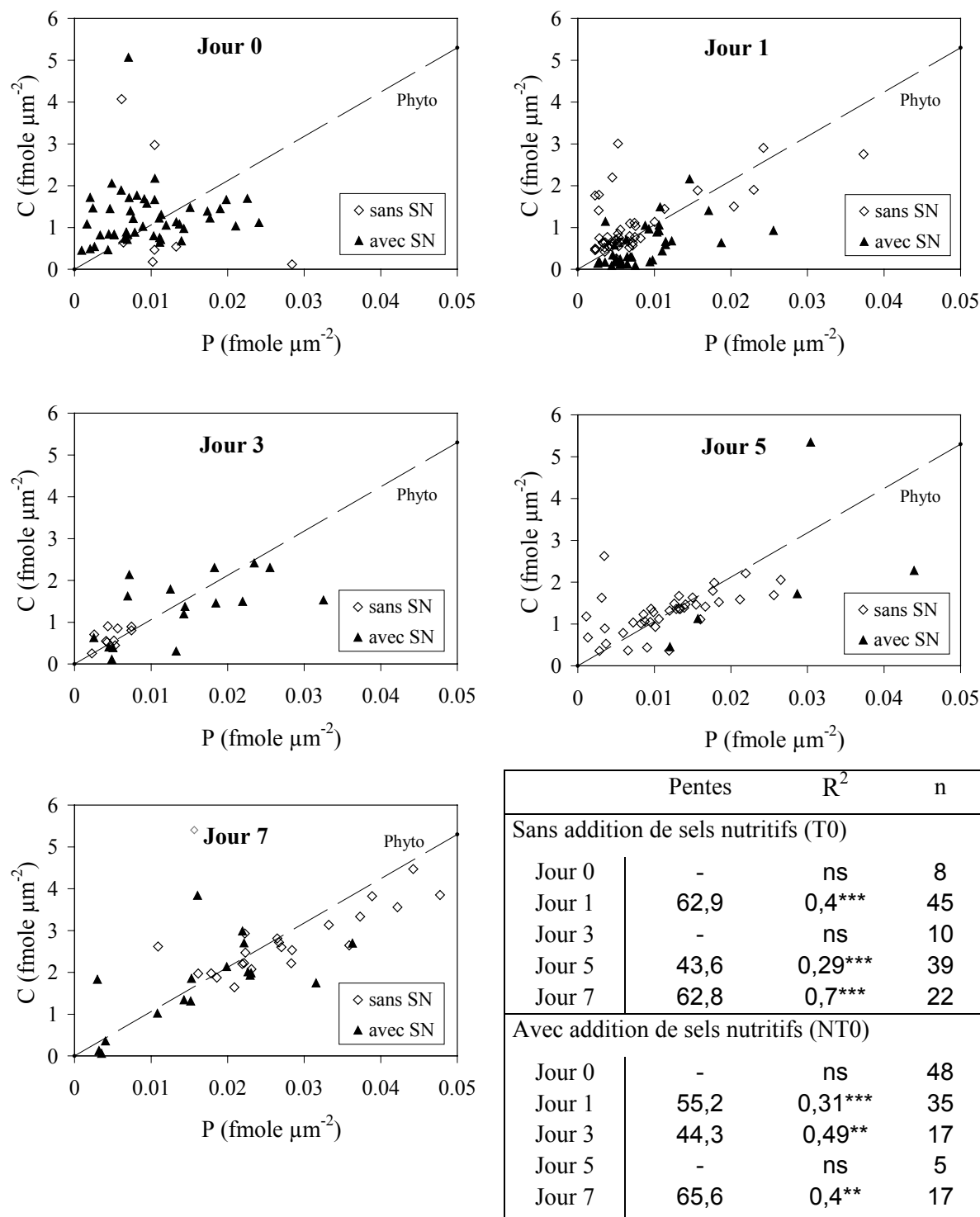


Figure V-7 : Composition élémentaire (C versus P) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation. Chaque point représente une particule individuelle. La droite discontinue illustre la droite théorique pour le phytoplancton ($C/P = 106/1$). Le tableau récapitule les pentes des droites de régression associées à leur coefficient de détermination (ns = non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$). Les pentes nous renseignent sur les rapports molaires C/P des particules.**

Azote versus Phosphore

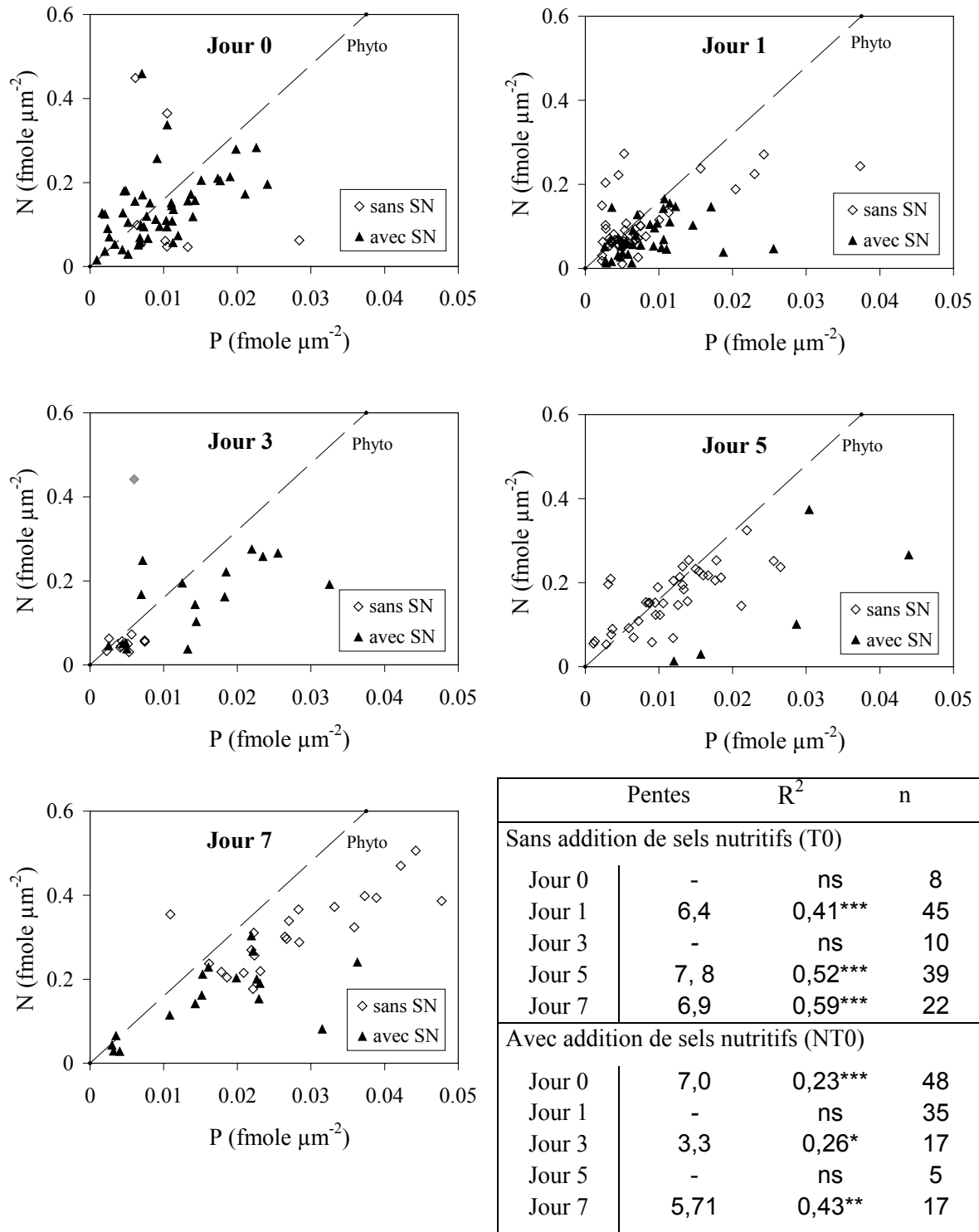


Figure V-8 : Composition élémentaire (N versus P) des particules organiques avec ou sans addition de sels nutritifs, durant les 7 jours d'expérimentation. Chaque point représente une particule individuelle. La droite discontinue illustre la droite théorique pour le phytoplancton (N/P = 16/1). Le tableau récapitule les pentes des droites de régression associées à leur coefficient de détermination (ns = non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; * p < 0,001). Les pentes nous renseignent sur les rapports molaires N/P des particules.**

Le rapport N/P est également variable et toujours inférieur à 16 (Figure V-8). Les particules analysées sont donc relativement pauvres en azote comparativement au phosphore. Ces particules organiques ne composent donc pas le carbone, l'azote et le phosphore selon le rapport théorique de Redfield. Leur relative richesse en phosphore par rapport à l'azote pourrait être un indicateur du statut trophique du milieu, ce que nous discuterons par la suite.

Le Tableau V-IV récapitule les rapports molaires C/N de la matière organique particulaire totale (MOP ; déterminées par filtration sur GF/F et analyse au CHN, chapitre IV) dans les mésocosmes non enrichis (T0) et enrichis en sels nutritifs (NT0), et les compare aux rapports molaires C/N des particules organiques analysées lors de cette étude. Dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs, le rapport C/N de la MOP est globalement inférieur au rapport C/N des particules organiques, sauf le cinquième jour des expériences. Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT0), le rapport C/N de la MOP et celui des particules organiques analysées au MET montrent des valeurs très similaires en particulier en fin d'expérience ($C/N_{MET} = 0,94 C/N_{GF/F} + 0,25$; $R^2 = 0,75$; $n = 5$).

Tableau V-IV : Rapports molaires C/N de la matière organique particulaire totale (MOP) déterminés après filtration sur GF/F et rapports molaires C/N des particules organiques analysées au MET-rayons X, durant les 7 jours d'expérimentation, dans T0 et dans NT0.

Jours	Sans addition de sels nutritifs (T0)		Avec addition de sels nutritifs (NT0)	
	MOP (GF/F)	Particules organiques (MET)	MOP (GF/F)	Particules organiques (MET)
0	$7,7 \pm 0,4$	8,9	$7,2 \pm 0,2$	6,7
1	$7,9 \pm 0,4$	9,5	$7,0 \pm 0,2$	5,3
3	$7,6 \pm 0,3$	13,8	$6,4 \pm 0,5$	8,0
5	$8,5 \pm 0,6$	6,1	$11,3 \pm 0,3$	11,2
7	$6,3 \pm 0,8$	7,4	$9,7 \pm 0,4$	9,7

3. Contribution des TEP au cycle biogéochimique des éléments

a) Dans l'eau de mer naturelle

En considérant que les particules analysées au MET-Rayons X sont représentées par les TEP, alors on obtient une estimation de la contribution des TEP au cycle des éléments dans l'eau de mer naturelle de Raunefjord (Tableau V-V). Les TEP apporteraient de 0,16 à 5,49

$\mu\text{mol C l}^{-1}$, de 0,02 à 0,61 $\mu\text{mol N l}^{-1}$ et de 0,001 à 0,04 $\mu\text{mol P l}^{-1}$ (soit de 1 nM à 40 nM de phosphore). Les TEP semblent également être une source de magnésium (jusqu' à 160 nM) et de calcium (jusqu'à 60 nM). Le calcium et le magnésium permettent l'intégrité structurale des particules exopolymériques transparentes. Enfin, les TEP semblent représenter un stock de fer et de manganèse non négligeable, puisque les concentrations de ces éléments liés aux TEP atteignent respectivement 2 nM Mn et 20 nM Fe.

Tableau V-V: Estimations de la concentration en éléments liés aux TEP ($\mu\text{mol l}^{-1}$) lors des conditions naturelles (Jour 0, n = 56). Les valeurs dans le tableau représentent les gammes de variation (minima-maxima).

Eléments	C	N	Mg	P	Ca	Mn	Fe
Concentrations	0,16-5,49	0,02-0,61	0,00-0,16	0,001-0,04	0,00-0,06	0,00-0,002	0,00-0,02

b) Cas particulier du carbone

Dans l'eau de mer naturelle, la concentration en carbone organique particulaire (COP) est de $31,4 \pm 2,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Tableau V-VI). Les TEP représenteraient donc de 0,5% à 17,5% du COP lors des conditions initiales. Le contenu en carbone des TEP, calculé par le biais de l'équation prédictive est cohérent avec les données du MET. Lors des conditions initiales, la formule de conversion semble bien adaptée pour estimer la concentration en carbone des TEP.

Tableau V-VI : Valeurs du carbone organique particulaire (COP), du carbone lié aux TEP déterminé à partir des données du MET (TEP- C_{MET}), et calculé selon l'équation prédictive (TEP- $C_{\text{calculé}}$), dans l'eau de mer naturelle.

	Méthode	Valeurs ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	n
COP	Filtration sur GF/F	$31,4 \pm 2,2$ (moyenne \pm écart-type)	6
TEP- C_{MET}	MET-rayons X	0,2 à 5,5 (gamme de variation)	56
TEP- $C_{\text{calculé}}$	Equation prédictive	$5,1 \pm 0,9$ (moyenne \pm écart-type)	2

Dans les mésocosmes non enrichis en sels nutritifs, le carbone organique particulaire diminue de $32,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ à $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ durant les 7 jours d'expérience (Figure V-9). La concentration en carbone des TEP estimée à partir des données du MET ne dépasse jamais $7,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ et représente de 0,5 à 17,5% du COP le jour 0 et de 12 à 33% du COP en fin

d'expérience. Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs, on observe une forte augmentation du COP jusqu'au jour 5 ($115,64 \mu\text{mol l}^{-1}$) puis une diminution en fin d'expérience. Les valeurs de TEP- C_{MET} suivent la même évolution avec des valeurs maximales atteintes le jour 5, elles dépassent alors les valeurs du COP ($140,91 \mu\text{mol C l}^{-1}$). Les valeurs du TEP- $C_{\text{calculé}}$ sont systématiquement supérieures aux valeurs du TEP- C_{MET} , dans chacun des mésocosmes. L'équation convertissant le spectre de taille des TEP en contenu en carbone surestime donc probablement le contenu en carbone des TEP. La corrélation entre le TEP-C calculé et le TEP-C estimé au MET est forte, en particulier avec les valeurs maximales des gammes de variations ($\text{TEP-C}_{\text{calculé}} = 1,17 \text{ TEP-C}_{\text{MET-max}} + 6,84$; $R^2 = 0,97$; $n = 5$). Les valeurs estimées avec ces deux méthodes sont cohérentes. La formule de conversion est donc relativement bonne, même si elle a tendance à surestimer les résultats, en particulier dans NT0. Ceci suggère également que les particules organiques analysées au microscope électronique à transmission peuvent être assimilées aux particules exopolymériques transparentes. Enfin, nos résultats précédents sont renforcés : les TEP représentent un réservoir de carbone important dans le milieu marin.

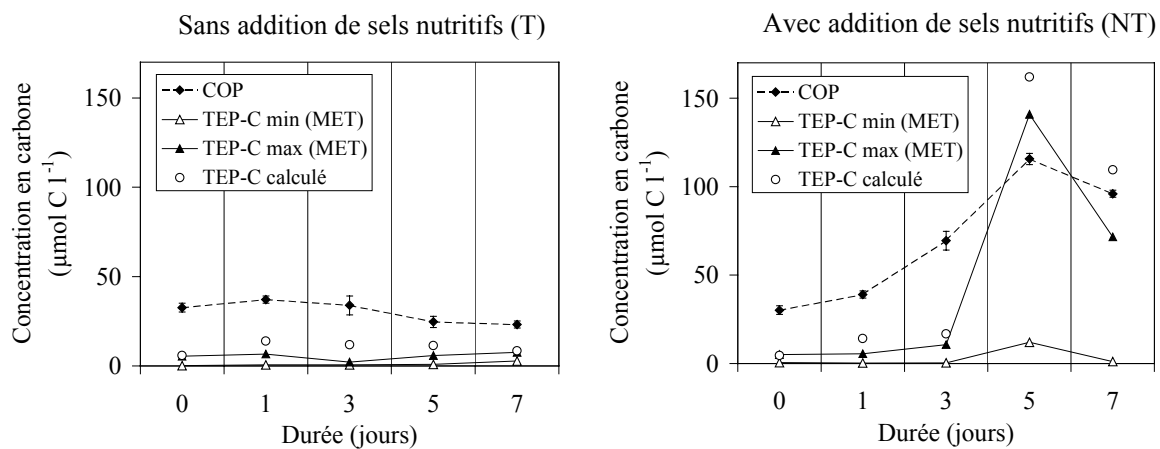


Figure V-9 : Carbone organique particulaire (COP), carbone organique lié aux TEP déterminé avec le MET (TEP- C_{MET}) et calculé selon l'équation de Mari (1999 ; TEP- $C_{\text{calculé}}$) dans les mésocosmes non enrichis (à gauche) et enrichis en sels nutritifs (à droite), durant les 7 jours d'expérimentation.

D. DISCUSSION

1. La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X : une nouvelle approche pour l'étude des Particules Exopolymériques Transparentes

La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X offre une nouvelle approche dans l'étude des particules exopolymériques transparentes. Cette méthode préserve les assemblages natifs dans l'eau de mer sans ajout de fixateur ou de colorant qui pourraient interférer avec l'analyse des éléments et introduire des artefacts non contrôlables. En plus d'une étude descriptive, le couplage du MET avec une micro-analyse aux rayons X permet d'obtenir une estimation précise de la composition élémentaire des particules organiques et donc d'aider à la compréhension de leur rôle fonctionnel dans la colonne d'eau. Cette méthode offre une très bonne reproductibilité (erreur de 1% pour le carbone, de 3-4% pour le rapport C/N), la répétition d'un grand nombre d'analyses n'est donc pas nécessaire (Norland *et al.* 1995).

Les particules analysées dans cette étude sont organiques et non vivantes. Leur morphologie est similaire à celle des TEP observées après coloration au bleu Alcian. Les TEP sont formées par l'alignement de polymères promu par des ponts cationiques de calcium et de magnésium (Alldredge *et al.* 1993, Chin *et al.* 1998). Or les particules analysées sont de nature fibrillaire et sont relativement riches en ces deux éléments. Dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs en particulier, où la formation de TEP est importante, le Ca et le Mg sont trouvés en plus forte concentration, en fin d'expérience, suggérant que ces éléments jouent un rôle dans la formation et l'agrégation de ces particules. Les particules analysées au MET deviennent abondantes après quelques jours d'expérimentation, dans les mésocosmes soumis à un enrichissement en sels nutritifs, et lorsque les conditions trophiques deviennent limitantes. Les TEP déterminées après comptage dans ces mêmes conditions montrent des caractéristiques semblables. Enfin, l'estimation du contenu en carbone des TEP basée sur leur spectre de taille (Mari 1999) et le contenu en carbone des TEP déterminé directement via l'analyse au MET-rayons X montrent des valeurs cohérentes. L'ensemble de ces résultats suggère que les particules analysées dans cette étude sont constituées majoritairement de particules exopolymériques transparentes.

2. Contribution des TEP aux cycles du carbone, de l'azote et du phosphore

a) Rôle des TEP dans la surconsommation de CID

Les ressources nutritives du milieu ont un effet significatif sur le rapport C/N des TEP. Lorsque le milieu devient limitant en azote pour le phytoplancton, leur rapport C/N augmente significativement. Le taux de photosynthèse (et donc d'assimilation du carbone inorganique dissous) est dicté par l'irradiance du milieu, tandis que le taux de croissance des cellules est déterminé par la disponibilité en nutriments. En conditions limitantes en sels nutritifs, les produits carbonés de la photosynthèse se trouvent rapidement en excès dans la cellule. Or, la cellule algale doit maintenir un quota en carbone, en azote et en phosphore stable, nécessaire au bon fonctionnement de son métabolisme. Le surplus de carbone est donc exsudé dans le milieu (Fogg 1983). Ce processus explique l'assimilation de carbone inorganique dissous alors que le milieu est limitant en azote (référéncé comme étant une surconsommation de carbone inorganique dissous par rapport à l'azote, Sambrotto *et al.* 1993, Toggweiler 1993 ; cf chapitre III), et implique la présence d'un pool de matière organique possédant un rapport C/N élevé. Notre étude à micro-échelle confirme donc bien que les TEP seraient le sous-produit de cette surconsommation de carbone inorganique dissous. Elle montre également que ce processus s'effectue rapidement (à l'échelle de la journée). En Méditerranée Nord-Occidentale, nous avons également montré que le pool de TEP possède un rapport C/N élevé, notamment en période ultra-oligotrophe. Cependant les TEP étaient produites en laboratoire par le biais d'une méthode de bullage accélérant leur formation à partir de leur précurseurs colloïdaux. Les résultats issus de l'analyse au MET et ceux issus de la colonne de bullage sont similaires. Ainsi, la méthode de bullage permettant d'obtenir des TEP « pures » à partir d'eau de mer naturelle, s'avère être une technique idéale pour isoler les TEP à partir d'eau de mer naturelle, en vue d'analyses ultérieures. Lors de notre étude à DYFAMED, le rapport C/N de la matière organique particulaire naturelle montrait des valeurs relativement constantes durant l'année et proches du rapport de Redfield. Tandis que le pool de TEP, ainsi que son rapport C/N, augmentaient fortement de la floraison printanière à la fin de la période stratifiée. Ces résultats en apparence incohérents, signifiaient que le pool de TEP n'était pas comptabilisé dans les mesures de carbone organique particulaire. Dans les mésocosmes non enrichis (T0), le rapport C/N de la MOP totale ne reflète pas le rapport C/N élevé des TEP déterminé au MET, tandis que dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT0), les rapports sont similaires en fin d'expérience quand le pool de TEP est élevé. Dans T0, la fraction volumique

des TEP varie de 2,9 à 4,8 ppm durant les 7 premiers jours d'expérimentation, dans NT0 elle varie de 2,4 à 40,1 ppm avec un maxima à 114,2 ppm le jour 5. A DYFAMED, les valeurs maximales observées étaient de 8 ppm en juin 1999. Ces résultats suggèrent que le pool de TEP est pris en compte dans les mesures de la matière organique particulaire, uniquement si la fraction volumique des TEP est très grande. Les TEP sont flexibles et peuvent passer à travers les pores des filtres GF/F (Passow & Alldredge 1995b). Les valeurs de carbone organique particulaire en milieu naturel, pourraient donc être sous-estimées dans la mesure où elles n'incluraient pas la totalité du pool de TEP. Le rôle de ces particules dans le cycle du carbone des océans est donc probablement négligé. Dans cette étude par exemple, ces particules peuvent représenter jusqu'à 17,5% du COP.

L'équation convertissant le spectre de taille des TEP en pool de carbone (Mari 1999) n'est pas toujours adaptée et globalement, surestime le contenu en carbone des TEP. Elle offre en effet, un résultat global sans tenir compte des variations de la composition en C existant entre les particules. La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X offre de nouvelles perspectives quant à la compréhension du rôle des TEP dans les cycles biogéochimiques des éléments et notamment dans celui du carbone.

b) Régulation du rapport C/N des TEP

Dans les mésocosmes, le rapport C/N des TEP diminue en fin d'expérience pour atteindre des valeurs à nouveau proches du rapport de Redfield (en particulier dans T0). Il existerait donc des processus rapides régulant le rapport C/N des TEP. Kepkay *et al.* (1997) ont montré, *in situ*, qu'à la fin d'une efflorescence phytoplanctonique, les processus de respiration microbienne entraînaient la dégradation sélective de carbone organique colloïdal et de faible poids moléculaire, associé à la production d'exsudats de diatomées. Cette dégradation conduit à une diminution du rapport C/N de la matière organique totale vers des valeurs proches de celles de Redfield. Or dans notre étude, les TEP sont largement colonisées par les bactéries. Il est donc possible que les bactéries jouent un rôle dans la dégradation de ces particules, en libérant des ecto-enzymes telles que des glucosidases (Grossart & Simon 1998, Sempéré *et al.* 2000). L'activité bactérienne ainsi que l'activité glucosidase sont davantage influencées par la disponibilité en phosphore que par celle en nitrates (Fajon *et al.* 1999). Ces auteurs ont montré que l'addition de phosphore entraîne l'augmentation de l'activité bactérienne et par voie de conséquence, celle de la dégradation des polysaccharides extracellulaires, même lorsque les nitrates sont épuisés. Dans notre étude, les concentrations

relativement élevées en phosphate pourraient maintenir une activité microbienne enzymatique suffisante, induisant une diminution du rapport C/N des TEP en fin d'expérience.

c) Origines de l'azote et du phosphore des TEP

L'azote et le phosphore des TEP ont deux origines potentielles : ils proviennent des exsudats phytoplanctoniques à l'origine de la formation des TEP ou sont adsorbés secondairement après formation des TEP. Le phytoplancton est capable d'exsuder des sucres azotés tels que la glucosamine ou la galactosamine (Benner & Kaiser 2003), des acides aminés et dans une moindre mesure, des protéines (Granum *et al.* 2002, Solomon *et al.* 2003). Cependant lorsque le milieu est pauvre en azote, les exsudats phytoplanctoniques sont composés majoritairement de polysaccharides et de monosaccharides, tandis que l'excrétion d'acides aminés devient négligeable (2% ; Granum *et al.* 2002). Ces auteurs ont montré également qu'en période de limitation en azote, les algues sont capables de réduire leur contenu cellulaire en cet élément et d'entrer en phase de faible activité. Il est donc peu probable que dans les mésocosmes où règnent des conditions déficientes en azote, les cellules algales libèrent des produits azotés. Nous suggérons donc que l'azote et le phosphore contenus dans les TEP proviennent davantage d'une adsorption secondaire de composés dissous présents dans le milieu. Schuster *et al.* (1998) ont montré que les polysaccharides originaires du phytoplancton sont capables d'adsorber des acides aminés. Il est donc probable que les TEP agissent comme des éponges en adsorbant les molécules chargées tels que les acides aminés ou les composés inorganiques (nitrates, phosphates). Dans cette étude, les conditions trophiques ne sont jamais limitantes en phosphore, or les rapports C/P et N/P des TEP sont toujours inférieurs au rapport de Redfield, suggérant que les TEP sont relativement riches en phosphore. La composition élémentaire des TEP serait donc un indicateur du statut trophique du milieu.

Les TEP concentrent-elles l'azote et le phosphore ?

Le jour 5 par exemple, les concentrations en nitrates sont de 0,24 μM dans T0 et inférieures au seuil de détection dans NT0. Les concentrations en phosphates sont de 0,17 μM dans T0 et de 0,07 μM dans NT0. Selon nos estimations basées sur la surface totale des TEP dans les mésocosmes, la concentration en N apporté par les TEP serait de 0,12 à 0,72 μM dans T0 et de 0,34 à 9,85 μM dans NT0. De la même manière, les concentrations en P lié aux TEP varieraient de 0,002 à 0,059 μM dans T0 et de 0,31 à 1,16 μM dans NT0. Ces estimations sont calculées en considérant les TEP comme des sphères parfaites, elles

surestiment donc probablement les valeurs. Cependant, elles montrent que les TEP pourraient concentrer ces éléments et pourraient donc constituer une source potentiellement importante d'azote et de phosphore pour les bactéries et le phytoplancton lorsque les nutriments deviennent limitants.

3. Contribution des TEP dans le cycle des métaux-traces

Le fer et le manganèse sont des métaux-traces, appelés micro-nutriments car présents en faible quantité dans les milieux aquatiques comparativement aux sels nutritifs tels que les nitrates ou les phosphates. Malgré leur faible concentration (de l'ordre du nM), ils sont essentiels dans les processus métaboliques du phytoplancton (Hutchins 1995), mais également des bactéries (Kirchman *et al.* 2003). Ces micro-nutriments sont en effet impliqués dans l'assimilation de l'azote (en tant que co-facteur d'enzymes), dans la fixation d'azote atmosphérique, dans la respiration et la photosynthèse.

Dans notre étude, les TEP peuvent apporter jusqu'à 2 nmol l⁻¹ de manganèse, et jusqu'à 20 nmol l⁻¹ de fer en conditions naturelles. En Atlantique Nord, les valeurs de manganèse et de fer dissous rapportées dans la littérature sont plus faibles comparativement aux données concernant les mers semi-fermées (Mer du Nord, Mer de Norvège) et les fjords qui sont influencés par les apports côtiers (Tableau V-VII). Schoemann (2000) a reporté par exemple des valeurs de fer dissous variant de 4 à 25 nmol l⁻¹ dans un fjord norvégien. Les éléments-traces liés aux TEP représentent des concentrations relativement élevées. Nos résultats suggèrent que les TEP peuvent être une source importante de fer et de manganèse associés à la phase particulaire.

Auparavant, la biodisponibilité du fer était supposée être fonction de la concentration des espèces de fer libres ou inorganiques (Anderson & Morel 1982). Cependant, des mesures récentes ont montré que plus de 90% du fer dans la phase dissoute (< 0,2 µm) se situent en réalité dans la phase colloïdale (>1 kDa), particulièrement dans la partie supérieure du spectre de taille (8 kDa à 0,2 µm) (Van den Berg 1995, Wells *et al.* 2000, Wu *et al.* 2001). La nature de ces ligands organiques est encore mal connue. Cependant, il a été montré que les exsudats phytoplanctoniques, de par leur richesse en polysaccharides anioniques, pouvaient adsorber de façon importante les métaux dans la colonne d'eau (Sueur *et al.* 1982, Vasconcelos *et al.* 2001). Lors d'une floraison de *Pheocystis*, la majorité du manganèse et du fer (environ 90%) est associée au mucus extracellulaire, tandis que 10% seulement sont assimilés par les cellules (Schoemann *et al.* 2001). Notre étude révèle que les TEP pourraient également représenter un

site d'adsorption privilégié pour les métaux-traces. Sachant que les particules exopolymériques transparentes sont en constant équilibre entre les phases dissoutes, colloïdales et particulaires, elles doivent contrôler également le fractionnement du fer entre ces différents compartiments et influencer ainsi sa biodisponibilité. Le fer associé aux colloïdes organiques est en effet assimilé de façon significative par le phytoplancton, notamment lorsque ces colloïdes organiques sont fraîchement produits (Chen *et al.* 2003). Bien que nos résultats ne permettent pas de conclure quant à la biodisponibilité des métaux liés aux TEP, nous suggérons que ces particules jouent un rôle non négligeable dans le cycle des éléments-traces dans le réseau trophique.

Tableau V-VII : Concentrations en manganèse et en fer (nmol l⁻¹) dans l'eau de mer (fraction dissoute) en zone de surface, dans des régions proches du site étudié, reportées dans la littérature.

Références	Localisation	Mn	Fer
Danielson <i>et al.</i> 1985	Mer Norvégienne	-	4,6-96
Nolting 1986	Mer du Nord (partie sud)	-	25,1
Martin <i>et al.</i> 1993	Atlantique Nord-Est	-	0,07-0,23
Wu & Luther 1994	Atlantique Nord-Ouest	-	< 1
Saager <i>et al.</i> 1997	Atlantique Nord Bassin islandais	0,5-0,7	-
Gledhill <i>et al.</i> 1998	Mer du Nord (partie nord) Côte norvégienne	- -	1,7 7,6
Schoemann <i>et al.</i> 1998	Côtes Belges et Hollandaises		50-200 (en 1993) 20-50 (en 1994)
De Baar <i>et al.</i> 2000	Mer du Nord (partie sud)	5	7
Schoemann 2000	Fjord norvégien (Balsfjord)	-	4-25
Cette étude (TEP)	Fjord norvégien (Raunefjord)	jusqu' à 2	jusqu' à 20

4. Conclusion

➡ La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X est une méthode précise et adéquate pour l'étude de la composition élémentaire des particules exopolymériques transparentes.

➡ Les TEP sont produites suite à l'exsudation du carbone organique phytoplanctonique synthétisé en surplus dans les cellules, lorsque le milieu est limitant en azote. Il s'agit d'un processus rapide. Ces résultats en milieu contrôlé, confirment le rôle des TEP dans la surconsommation de CID par le phytoplancton lorsque le milieu est appauvri en nitrates, observée en Méditerranée Nord-Occidentale. Leur richesse en carbone leur confère un rôle-clé dans le cycle du carbone.

➡ Les TEP ne combinent pas le C, le N et le P dans les proportions décrites par Redfield. Leur teneur en ces éléments pourrait être un indicateur du statut trophique du milieu.

➡ Les TEP agissent comme des éponges en concentrant le phosphore et l'azote du milieu. Elles pourraient donc représenter une source non négligeable de N et de P si ceux-ci sont accessibles aux cellules phytoplanctoniques et aux bactéries.

➡ Nos résultats mettent également en évidence le rôle des TEP comme ligand des métaux-traces. Associées aux TEP, ces substances-traces pourraient s'accumuler, sédimenter, ou être assimilées et réintégrées dans le réseau trophique.

Conclusion & Perspectives

« Les océanographes étudient le cycle du carbone et son rôle dans les changements climatiques à grande échelle, par le biais des données satellitaires. Mais ne pas explorer l'océan à micro-échelle, mène à l'impossibilité de comprendre et de prédire ces changements globaux. » (Azam & Long 2001).

Ce travail de recherche a été réalisé de façon à explorer les processus gouvernant la dynamique des particules exopolymériques transparentes à différentes échelles. Le suivi de la distribution saisonnière des TEP en Méditerranée Nord-Occidentale nous a offert une vision globale de leur importance en milieu pélagique oligotrophe. L'étude en milieu contrôlé nous a permis de mieux intégrer les processus biologiques, chimiques et physiques régissant leur dynamique. Enfin, nous avons exploré l'échelle atomique afin de définir leur contribution aux cycles biogéochimiques des éléments. L'ensemble des résultats nous a permis d'affiner notre compréhension du rôle des TEP dans le cycle du carbone océanique.

Un pool de matière organique à redéfinir

Les particules exopolymériques transparentes ont été découvertes il y a seulement dix ans (Alldredge *et al.* 1993) car leurs propriétés physico-chimiques rendent les analyses délicates. Ces particules possèdent des propriétés corpusculaires : en effet comme nous l'avons vu, elles sont caractérisées par des spectres de taille en accord avec la loi générale de la granulométrie. Mais à l'inverse des particules solides, elles montrent des propriétés de gels telle qu'une grande flexibilité et une forte propension à l'agrégation. Notre étude méthodologique a montré en effet, à quel point le choix de la technique de mise en évidence des TEP est importante, dans la mesure où les manipulations et la filtration peuvent induire l'agrégation de ces particules.

En effet, ces particules existent à l'interface entre les phases dissoutes et particulaires. Les polymères de polysaccharides constituant les TEP sont imbriqués en un réseau fibrillaire piégeant l'eau de mer, qui est en équilibre thermodynamique avec le milieu environnant (Chin *et al.* 1998). Les TEP sont donc constamment soumises à des processus de condensation et d'hydratation, en conséquence, leur taille et leur volume peuvent changer sans modification significative de leur masse (Passow 2002b). Ainsi, nos résultats ont montré que les mesures

de carbone organique particulaire telles qu'elles sont réalisées traditionnellement en milieu aquatique, sous-estiment une fraction du stock de TEP. En Méditerranée Nord-Occidentale, par exemple, alors que ces particules sont fortement abondantes, en particulier en été, les mesures *in situ* de carbone organique particulaire (COP) ne montrent pas un fort rapport C/N, propre à ces particules. Notre étude en milieu contrôlé confirme que la fraction des TEP n'est pas toujours comptabilisée dans les mesures de COP. Pourtant, elles peuvent représenter jusqu'à 15% du carbone organique total en Méditerranée Nord-Occidentale. Dans cette zone, les TEP montrent une distribution saisonnière similaire à celle du carbone organique dissous, avec une forte accumulation en surface durant la période estivale. Ces résultats suggèrent les fortes interactions existantes entre ces deux réservoirs de carbone, et la nécessité à l'avenir de considérer les TEP comme des *produits exopolymériques transparents* plutôt qu'en termes de particules.

Pour mieux comprendre leur contribution au cycle de la matière dans les océans, il s'avère nécessaire de connaître leur composition élémentaire. Nous avons développé une nouvelle approche pour la caractérisation élémentaire des TEP par le biais de la microscopie électronique à transmission couplée à une analyse aux rayons X. Même si cette méthode ne permet pas de différencier les molécules entrant dans la composition des TEP elle permet d'évaluer leur teneur en éléments, tel que le carbone, sans dénaturer les échantillons. Les TEP issues d'un fjord norvégien peuvent contenir de 1,4 à 60,9 fg C μm^{-2} , induisant une concentration en carbone organique variant de 0,2 à 5,5 $\mu\text{mol C l}^{-1}$. La microscopie électronique à transmission couplée à une micro-analyse aux rayons X offre de nouvelles perspectives dans l'étude de la composition élémentaire des particules exopolymériques transparentes.

Le développement de nouvelles techniques de caractérisation des TEP, nous éclaircira quant à leur importance en tant que pool de carbone dans les océans. La composition chimique précise des TEP est encore peu documentée. Seuls Gogou *et al.* (2000, Ocean Science meeting, Texas), ont montré par le biais d'une analyse par résonance magnétique que leur nature était proche de celles des polysaccharides acylés (APS), constitués majoritairement de rhamnose, de fucose, de mannose, de galactose et de glucose. Des améliorations dans la connaissance de leur structure chimique affinera notre compréhension de leur dynamique, spécialement de leur biodégradabilité. Pour cela des collaborations avec des chimistes plutôt qu'avec des écologistes pourraient être envisagées.

Rôle des TEP dans la surconsommation de carbone inorganique dissous

En Méditerranée Nord-Occidentale, depuis l'efflorescence printanière jusqu'à la fin de la période estivale, en conditions de limitation forte par les nutriments, une fraction significative du carbone assimilé est transféré vers le pool de TEP, via la coagulation des exsudats riches en polysaccharides. Ainsi, la production de TEP serait une voie majeure de transfert du carbone lors de la surconsommation de carbone inorganique dissous par le phytoplancton en période oligotrophe. La formation de TEP entraîne un découplage des dynamiques du carbone et de l'azote après la floraison phytoplanctonique modifiant alors la stochiométrie générale de la matière organique particulaire (rapport C/N élevé). Ce processus est rapide (de l'ordre de la journée).

Ceci induit que la production primaire n'est pas limitée à la production de biomasse mais inclut aussi les produits extracellulaires tels que la matière organique dissoute riche en carbone et les TEP. Les estimations de production primaire basées uniquement sur les variations de biomasse (appelée production primaire particulaire, Morán *et al.* 1999) sous-estiment donc une grande part de l'assimilation du carbone inorganique dissous par le phytoplancton.

A l'avenir, les mesures de production primaire (PP) devront tenir compte à la fois de la production primaire particulaire et dissoute, notamment dans des zones oligotrophes telle que la Méditerranée Nord-Occidentale. Les modèles utilisés pour quantifier les flux de carbone biogénique dans les océans, n'intègrent généralement pas la fraction dissoute exsudée lors de la photosynthèse et encore moins les échanges abiotiques de matière entre MOD et MOP. La prise en compte des TEP dans les futurs modèles modifieront probablement notre vision du cycle du carbone dans les océans.

Le réseau trophique basé sur l'agrégation

Au vu des résultats de ce travail de recherche, il apparaît que le réseau basé sur l'agrégation, évoqué dans l'introduction générale, joue un rôle prépondérant dans le réseau trophique pélagique. Les particules exopolymériques transparentes représentent une composante-clef de ce système (Figure VI-1). En période de limitation en azote, les cellules phytoplanctoniques (notamment les diatomées), mais aussi le nanoplancton, exsudent de larges quantités de matière organique dissoute, capables de s'agréger pour former des TEP. A l'inverse, celles-ci peuvent être soumises à des processus de solubilisation et intégrer à nouveau le pool de MOD. Un fort hydrodynamisme pourra accélérer la formation de TEP par

coagulation des particules et augmenter ainsi l'apparition d'agrégats (neige marine). Selon l'intensité de turbulence, ces agrégats persisteront dans la colonne d'eau ou seront exportés vers les zones profondes. Le flux vertical de matière est particulièrement important lorsque la communauté dominante est composée principalement de diatomées. Les TEP participeront donc au « nettoyage » de la zone de surface, en accélérant les exportations de cellules dégénérantes en suite d'une efflorescence. Nous avons vu également qu'une forte stratification de la colonne d'eau pouvait induire la persistance des TEP dans la zone euphotique. La dynamique des TEP dépendra donc de l'hydrodynamisme mais également de l'activité bactérienne. En effet, nos résultats ont montré que les interactions TEP/bactéries sont fortes, notamment sous condition de turbulence. Cependant, lors de ce travail, nous n'avons pas étudié les liens trophiques pouvant exister entre ces deux composants du réseau trophique. Nul doute que le devenir du pool de TEP sera largement influencé par la capacité ou non des bactéries à dégrader ces particules. Lors d'expériences préliminaires en microcosmes (11), nous avons montré que la communauté bactérienne change au bout de 48h, en présence de TEP, comparativement à des traitements ne contenant que de la MOD. En effet, la communauté initiale dominée par des bactéries rondes en début d'expérience, est dominée par des bactéries de forme filamenteuse, après 48h d'incubation.

De futures investigations sont nécessaires afin de mieux appréhender les interactions entre les TEP et les bactéries. Les bactéries liées aux TEP sont-elles actives? Développent-elles des adaptations particulières? La diversité bactérienne est-elle différente du milieu environnant? Les TEP représentent-elles une ressource nutritive disponible aux bactéries libres et attachées? La caractérisation des groupes bactériens est devenue possible grâce au développement des outils moléculaires. L'utilisation de sondes fluorescentes, telles que les sondes oligonucléotidiques, par le biais de l'hybridation *in situ* (FISH), permettra de répondre à ces problématiques.

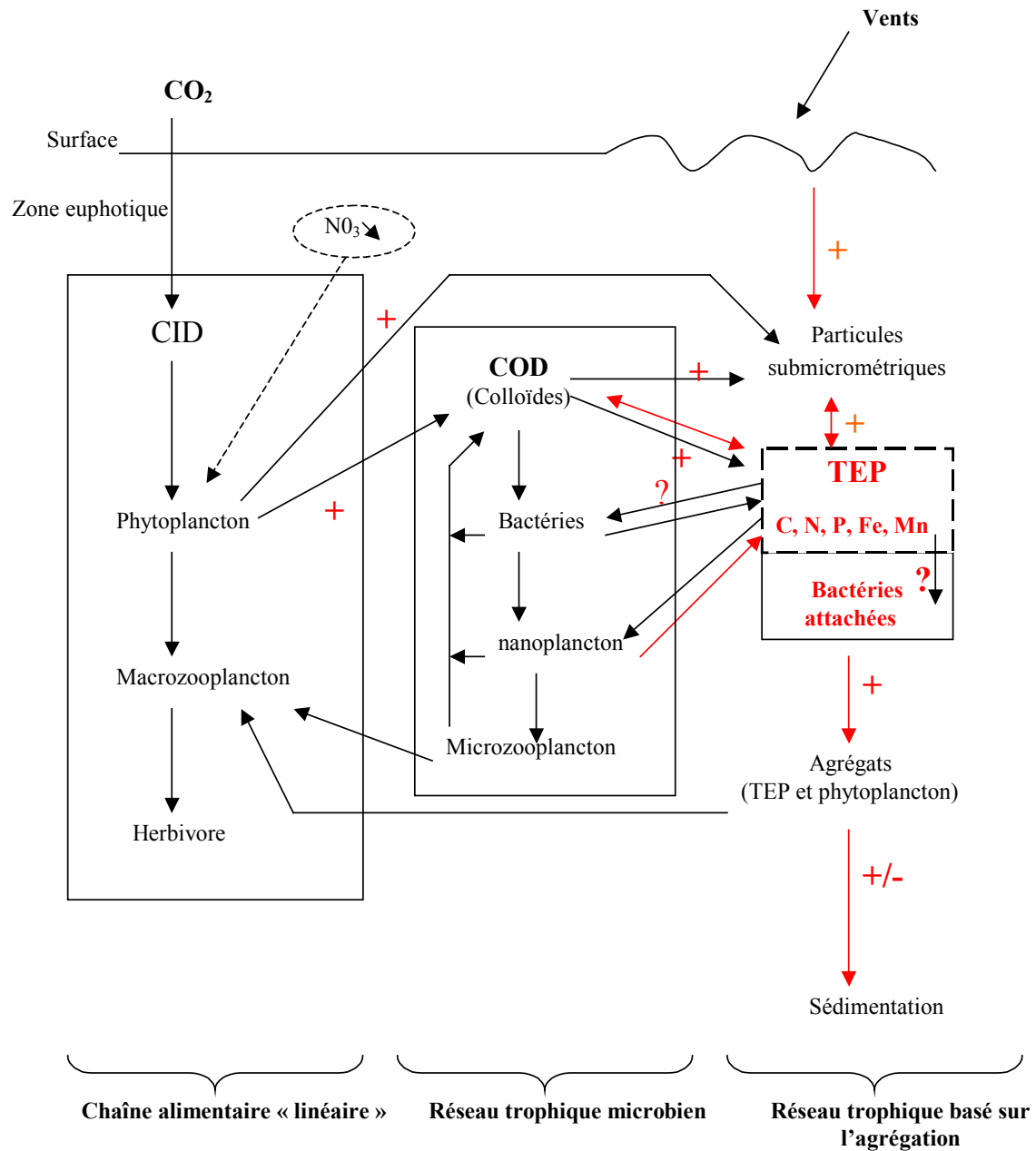


Figure VI-1 : Schéma conceptuel du réseau trophique en milieu pélagique, intégrant les résultats obtenus durant ce travail de thèse (en rouge), et quelques perspectives envisagées (points d'interrogation).

Une micro-niche écologique ?

La découverte de l'hétérogénéité à micro-échelle de la matière organique a modifié notre compréhension de l'écosystème pélagique. Les colloïdes et les particules submicrométriques structurent physiquement le système pélagique en un hydrogel dans lequel sont engluées les particules (phytoplancton, détritus) et les microbes, formant un continuum de matière organique (Azam & Long 2001). Nous avons montré que les TEP sont capables de concentrer les éléments-clefs dans les processus biologiques tels que l'azote et le phosphore et qu'elles sont fortement colonisées par les bactéries. Dans les systèmes oligotrophes en particulier, où l'azote et/ou le phosphore inorganiques sont déficients et où la production de TEP est importante, on peut supposer que ces particules contribuent à l'hétérogénéité de la colonne d'eau, en créant des zones relativement riches en ces éléments. Les TEP représenteraient alors de véritables « oasis » dans un milieu en apparence homogène. Si l'azote et le phosphore contenus dans les TEP sont assimilés par les micro-organismes, alors le réseau trophique basé sur les processus d'agrégation pourrait jouer un rôle important dans ces zones.

Le phosphore est un facteur de limitation dans les eaux de surface Méditerranéenne notamment durant la période estivale (Béthoux *et al.* 1998). La source de phosphore à DYFAMED dépend essentiellement des apports atmosphériques d'origine continentale : activité anthropique (Migon *et al.* 2001) et poussières sahariennes (Ridame & Guieu 2002). Les TEP, de par leur nature adhésive pourraient adsorber ces poussières riches en phosphore. Savoir si les TEP concentrent ces poussières et dans l'affirmative, étudier leur devenir dans la colonne d'eau (dégradation microbienne et/ou sédimentation), permettraient de mieux appréhender le rôle des TEP dans le cycle du phosphore.

Nous avons vu que les TEP constituent également un réservoir extracellulaire pour les métaux-traces tels que le fer et le manganèse. Ces métaux sont essentiels à la croissance phytoplanctonique. Sachant que les TEP sont en constant équilibre entre les phases dissoutes et particulaires, elles pourraient influencer la solubilité et la forme physico-chimique du fer et modifier alors le devenir des métaux-traces. Associés aux TEP, ces substances-traces pourraient s'accumuler, sédimenter, ou être assimilées et réintégrées dans le réseau trophique.

De futures investigations concernant la biodisponibilité des métaux liés aux TEP permettront de mieux comprendre leur rôle dans le cycle biogéochimique des éléments-traces. De telles études pourraient être menées dans les zones HNLC (« high-nutrient low chlorophyll

a »), zones riches en macro-nutriments, mais pauvres en chlorophylle *a*, où le fer est considéré comme le nutriment limitant la production primaire (Martin 1992). Des investigations en Méditerranée Nord-Occidentale, où l'apport de fer est particulièrement important en Méditerranée, via les particules atmosphériques issues des poussières sahariennes (Guieu *et al.* 1997), permettraient également d'évaluer le rôle des TEP en tant que ligand de métaux-traces. De par leur capacité à agir telles des colles biologiques, elles pourraient également adsorber des toxines et des métaux-lourds et agir comme des bio-dépolluants.

Nous avons montré l'importance des TEP en tant que pool de matière organique en Méditerranée Nord-Occidentale : ces particules font partie intégrante des systèmes oligotrophes. Sachant que 56% de l'océan mondial est oligotrophe (Antoine *et al.* 1996), alors leurs implications dans les processus biogéochimiques à l'échelle globale, sont probablement immenses. En milieu aquatique, la découverte de l'importance de la matière organique dissoute dans un premier temps, puis de celle des colloïdes et des particules sub-micrométriques ont changé notre compréhension du pelagos. Nul doute que la prise en considération des TEP lors des futures investigations, modifiera encore notre vision du cycle biogéochimique du carbone dans les océans. Cependant de telles recherches ne pourront se réaliser que par le biais de collaborations multidisciplinaires réunissant des microbiologistes, des chimistes, des physiciens ainsi que des modélisateurs. La base de données mondiale concernant les particules exopolymériques transparentes est encore loin d'être suffisante, nous espérons que leur étude sera incluse dans les futurs champs d'investigation.

Bibliographie

- Alcaraz M, Peters F, Arin L & Malits A (2002) Effects of turbulence conditions on the balance between production and respiration in marine planktonic community. *Marine Ecology Progress Series* 242:63-71
- Allredge AL, Cole JJ & Caron DA (1986) Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnology and Oceanography* 31:68-78
- Allredge AL & Gotschalk CC (1989) Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities. *Deep-Sea Research* 36:159-171
- Allredge AL & Gotschalk CC (1990) The relative contribution of marine snow of different origins to biological processes in coastal waters. *Continental Shelf Research* 10:41-58
- Allredge AL, Granata TC, Gotschalk CC & Dickey TD (1990) The physical strength of marine snow and its implications for particle disaggregation in the ocean. *Limnology and Oceanography* 35:1415-1428
- Allredge AL, Passow U & Logan BE (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research I* 40:1131-1140
- Allredge AL & Crocker KM (1995) Why do sinking mucilage aggregates accumulate in the water column? *Science of the Total Environment* 165:15-22
- Aluwihare LI & Repeta DJ (1999) A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. *Marine Ecology Progress Series* 186:105-117
- Amon RMW & Benner R (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 41(1):41-51
- Andersen V & Prieur L (2000) One-month study in the open NW Mediterranean Sea (DYNAPROC experiment, May 1995): overview of the hydrobiological structures and effects of wind events. *Deep-Sea Research I* 47:397-422
- Anderson MA & Morel FMM (1982) The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* 27:789-813
- Antoine D, André JM & Morel A (1996) Oceanic primary production: 2. Estimation at global scale from satellite (coastal zone color scanner) chlorophyll. *Global Biogeochemical Cycles* 10:57-69
- Arin L, Marrasé C, Maar M, Peters F, Sala MM & Alcaraz M (2002) Combined effects of nutrients and small-scale turbulence in a microcosm experiment. I. Dynamics and size distribution of osmotrophic plankton. *Aquatic Microbial Ecology* 29:51-61
- Avril B (2002) DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (Dyfamed site). *Deep-Sea Research II* 49:2163-2182
- Azam F, Smith DC, Steward GF & Hagström A (1993) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology* 28:167-179
- Azam F, Smith DC, Steward GF & Hagström A (1994) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology* 28:167-179
- Azam F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux : The plot thickens. *Science* 280:694-696
- Azam F & Long RA (2001) Sea snow microcosms. *Nature* 414:495-498
- Baines SB & Pace ML (1991) The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnology and Oceanography* 36:1078-1090

- Beauvais S & Pedrotti ML (2002) Formation of Transparent Exopolymeric Particles (TEP) in mesocosms under increasing turbulence levels with and without additional nutrients. European Geophysical Society (EGS) Colloque. Talk presentation, Nice (France).
- Benner R & Kaiser K (2003) Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 48:118-128
- Béthoux JP & Prieur L (1983) Hydrologie et circulation en Méditerranée Nord-Occidentale. *Pétroles et Techniques* 299:25-34
- Béthoux JP, Prieur L & Bong JH (1988) Le courant Ligure au large de Nice. *Oceanologica Acta* 9:59-67
- Béthoux JP, Morin P, Chaumery C, Connan O, Gentili B & Ruiz-Pino D (1998) Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental changes. *Marine Chemistry* 63:155-169
- Biddanda B & Benner R (1997) Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 42:506-518
- Buffle J, Wilkinson KJ, Stoll S, Filella M & Zhang J (1998) A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach. *Environmental Science and Technology* 32:2887-2899
- Carlson CA, Ducklow HW & Michaels AF (1994) Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature* 371:405-408
- Carrias JF, Serre JP, Sime-Ngando T & Amblard C (2002) Distribution, size, and bacterial colonization of pico- and nano-detrital organic particles (DOP) in two lakes of different trophic status. *Limnology and Oceanography* 47:1202-1209
- Chen M, Dei RCH, Wang WX & Guo L (2003) Marine diatom uptake of iron bound with natural colloids of different origins. *Marine Chemistry* 81:177-189
- Chin WC, Orellana MV & Verdugo P (1998) Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 391:568-572
- Claustre H (1994) The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures. *Limnology and Oceanography* 39:1206-1210
- Cole JJ, Findlay S & Pace ML (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43:1-10
- Copin-Montégut C (2000) Consumption and production on scales of a few days of inorganic carbon, nitrate and oxygen by the planktonic community: results of continuous measurements at the Dyfamed Station in the northwestern Mediterranean Sea (May 1995). *Deep-Sea Research* 47:447-477
- Copin-Montégut G & Avril B (1993) Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the North-Western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research* 40:1963-1972
- Corzo A, Morillo JA & Rodriguez S (2000) Production of transparent exopolymeric particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquatic Microbial Ecology* 23:63-72
- Coste B, Le Corre P & Minas HJ (1988) Re-evaluation of the nutrient exchanges in the Strait of Gibraltar. *Deep-Sea Research* 35:767-775
- Dam HG & Drapeau DT (1995) Coagulation efficiency, organic-matter glues, and the dynamics of particles during a phytoplankton bloom in a mesocosm study. *Deep-Sea Research* 42:111-123
- Dandonneau Y & Le Bouteillier A (1992) A simple and rapid device for measuring planktonic primary production by in situ sampling, and ^{14}C injection and incubation. *Deep-Sea Research* 39:795-803

- Danielson LG, Magnusson B & Westerlund B (1985) Cadmium, copper, nickel and zinc in the north-east Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 17:23-41
- De Baar HJW, Boye M, De Jong JTM, Van den Berg CMG & Nolting RF (2000) Spatial distribution of dissolved iron, aluminium and manganese in the northeast atlantic ocean. European Geophysical Society (EGS) Nice, poster.
- Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology - An annual review* - 28:73-153
- Degobbis D, Fonda-Umani S, Franco P, Malej A, Precali R & Smolaka N (1995) Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of gelatinous aggregates. *Science of the Total Environment* 165:43-58
- Dolan JR, Sall N, Metcalfe A & Gasser B (2003) Effects of turbulence on the feeding and growth of a marine oligotrich ciliate. *Aquatic Microbial Ecology* 31:183-192
- Duce RA & Tindale NW (1991) Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. *Limnology and Oceanography* 36:1715-1726
- Engel A & Schartau M (1999) Influence of transparent exopolymeric particles (TEP) on sinking velocity of *Nitzschia closterium* aggregates. *Marine Ecology Progress Series* 182:69-76
- Engel A (2000) The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particle stickiness during the decline of a diatom bloom. *Journal of Plankton Research* 22:485-497
- Engel A & Passow U (2001) Carbon and nitrogen content of transparent exopolymeric particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Marine Ecology Progress Series* 219:1-10
- Engel A (2002) Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymeric particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24:49-53
- Engel A, Goldthwait S, Passow U & Alldredge A (2002) Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnology and Oceanography* 47:753-761
- Eppley RW & Peterson BJ (1979) Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* 282:677-680
- Fajon C, Cauwet G, Lebaron P, Terzic S, Ahel M, Malej A, Mozetic P & Turk V (1999) The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS Microbiology Ecology* 29:351-363
- Farrington J (1992) Overview and key recommendations. Marine organic geochemistry workshop. *Marine Chemistry* 39:5-9
- Fernández M, Bianchi M & Van Wambeke F (1994) Bacterial biomass, heterotrophic production and utilization of dissolved organic matter photosynthetically produced in the Almeria-Oran front. *Journal of Marine Systems* 5:313-325
- Fogg GE (1983) The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina* 26:3-14
- Fuhrman JA & Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology* 66:109-120
- Fukuda H & Koike I (2000) Feeding currents of particle-attached nanogelagellates-a novel mechanism for aggregation of submicron particles. *Marine Ecology Progress Series* 202:101-112

- Fukuda R, Ogawa H, Nagata T & Koike I (1998) Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3352-3358
- Garcia CM, Prieto L, Vargas M, Echevarria F, Garcia-Lafuente J, Ruiz J & Rubin JP (2002) Hydrodynamics and the spatial distribution of plankton and TEP in the Gulf of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *Journal of Plankton Research* 24:817-833
- Gargett AE (1997) "Theories" and techniques for observing turbulence in the ocean euphotic zone. *Scientia Marina* 61:25-45
- Gledhill M, Van den Berg CMG, Nolting RF & Timmermans KR (1998) Variability in the speciation of iron in the northern North Sea. *Marine Chemistry* 59:283-300
- Gogou A, Repeta DJ & Honjo S (2000) Chemical characterization of dissolved and particulate matter in seawater. Do particles pump DOM from the surface to the deep ocean? Ocean Science Meeting, San Antonio, Texas.
- Gordon DCJ (1970) A microscopic study of organic particles in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* 17:175-185
- Granum E, Kirkvold S & Mykkestad S (2002) Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242:83-94
- Grossart HP & Simon M (1997) Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnology and Oceanography* 42:1651-1659
- Grossart HP, Berman T, Simon M & Pohlman K (1998) Occurrence and microbial dynamics of macroscopic organic aggregates (lake snow) in Lake Kinneret, Israel, in fall. *Aquatic Microbial Ecology* 14:59-67
- Grossart HP & Simon M (1998) Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquatic Microbial Ecology* 15:127-140
- Grossart HP (1999) Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis* and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* 19:1-11
- Grout H, Sempere R, Thill A, Calafat A, Prieur L & Canals M (2001) Morphological and chemical variability of colloids in the Almeria-Oran Front in the eastern Alboran sea (SW Mediterranean Sea). *Limnology and Oceanography* 46:1347-1357
- Guieu C, Chester R, Nimmo M, Martin J-M, Guerzoni S, Nicolas E, Mateu J & Keyse S (1997) Atmospheric inputs of dissolved and particulate metals to the Northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research* 44:655-674
- Hagström A, Pinhassi J & Zweifel UL (2001) Marine bacterioplankton shows burst or rapid growth induced by substrate shifts. *Aquatic Microbial Ecology* 24:109-115
- Hedges J (1987) Organic matter in seawater. *Nature* 330:205-206
- Heldal M, Norland S & Tumyr O (1985) X-ray microanalytic method for measurements of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 50:1251-1257
- Heldal M, Norland S, Fagerbakke KM, Thingstad F & Bratbak G (1996) The Elemental Composition of Bacteria: A Signature of Growth Conditions? *Marine Pollution Bulletin* 33:3-9
- Heldal M, Norland S, Purdie DA & Knap AH (2002) Elemental C,N and P cell content of individual bacteria collected at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. *Limnology and Oceanography* 47:1525-1530
- Hewes CD & Holm-Hansen O (1983) A method for recovering nanoplankton from filters for identification with the microscope: The filter-transfer-freeze (FTF) technique. *Limnology and Oceanography* 28 (2):389-394

- Hill PS, Nowell ARM & Jumars PA (1992) Encounter rate by turbulent shear of particles similar in diameter to the Kolmogorov scale. *Journal of Marine Research* 50:643-668
- Horobin R (1988) *Understanding Histochemistry: Selection, evaluation and design of biological stains*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England.
- Hutchins DA (1995) Iron and the marine phytoplankton community. *Progress in Phycological Research* (Biopress, UK) 11:1-48
- Jackson GA (1990) A model of the formation of marine algal flocs by physical coagulation processes. *Deep-Sea Research* 37:1197-1211
- Jensen LM & Søndergaard M (1982) Abiotic formation of particles from extracellular organic carbon released by phytoplankton. *Microbial Ecology* 8:47-54
- Johnson BD, Zhou X & Wangersky PJ (1986) Surface Coagulation in sea water. *Netherlands Journal of Sea Research* 20:201-210
- Kähler P & Koeve W (2001) Marine dissolved organic matter: can its C:N ratio explain carbon overconsumption? *Deep-Sea Research I* 48:49-62
- Kepkay PE & Johnson BD (1988) Microbial response to organic particle generation by surface coagulation in seawater. *Marine Ecology-Progress Series* 48:193-198
- Kepkay PE (1991) Surface coagulation and microbial respiration in response to local advection and sea state in the North Atlantic. *Marine Ecology Progress Series* 69:143-147
- Kepkay PE, Niven SEH & Milligan TG (1993) Low molecular weight and colloidal DOC production during a phytoplankton bloom. *Marine Ecology Progress Series* 100:233-244
- Kepkay PE (1994) Particle aggregation and the biological reactivity of colloids. *Marine Ecology Progress Series* 109:293-304
- Kepkay PE, Jellett JF & Niven SEH (1997) Respiration and the carbon-to-nitrogen ratio of a phytoplankton bloom. *Marine Ecology Progress Series* 150:249-261
- Kjørboe T, Andersen KP & Dam H (1990) Coagulation efficiency and aggregate formation in marine phytoplankton. *Marine Biology* 107:235-246
- Kjørboe T & Hansen LS (1993) Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *Journal of Plankton Research* 15:993-1018
- Kirchman DL, Suzuki Y, Garside C & Ducklow HW (1991) High turnover rates of dissolved organic carbon during a spring phytoplankton bloom. *Nature* 352:612-614
- Kirchman DL, Hoffman KA, Weaver R & Hutchins DA (2003) Regulation of growth and energetics of a marine bacterium by nitrogen source and iron availability. *Marine Ecology Progress Series* 250:291-296
- Koike I, Hara S, Terauchi K & Kogure K (1990) Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature* 345:242-244
- Kolmogorov AN (1941) Dissipation of energy in a locally isotropic turbulence. In: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. (ed.) Vol.32, (Reprinted in *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, 434: 15-17, 1991).16-18
- Lancelot C (1995) The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of the North Sea. *Science of the Total Environment* 165:83-102
- Lazier JRN & Mann KH (1989) Turbulence and the diffusive layers around small organisms. *Deep-Sea Research* 36:1721-1733
- Legendre L & Rivkin RB (2002) Fluxes of carbon in the upper ocean: regulation by food-web control nodes. *Marine Ecology Progress Series* 242:95-109
- Legendre P & Legendre L (1984) *Ecologie numérique*. 260p, Masson, Paris.

- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay MD, Rinaldi P & Gattuso JP (2002) Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 29:227-237
- Leppard GG, Heissenberger A & Herndl G (1996) Ultrastructure of marine snow. I. Transmission electron microscopy methodology. *Marine Ecology Progress Series* 135:289-298
- Lilliefors HW (1967) On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *ASA Journal* 399-402
- Ling SC & Alldredge AL (2003) Does the marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)? *Journal of Sea Research* 25:507-515
- Logan BE & Wilkinson DB (1990) Fractal geometry of marine snow and other biological aggregates. *Limnology and Oceanography* 35:130-136
- Logan BE, Grossart HP & Simon M (1994) Direct observation of phytoplankton, TEP and aggregates on polycarbonate filters using brightfield microscopy. *Journal of Plankton Research* 16:1811-1815
- Logan BE, Passow U, Alldredge AL, Grossart H-P & Simon M (1995) Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Research II* 42:203-214
- Maar M, Arin L, Simo R, Sala MM, Peters F & Marrasé C (2002) Combined effects of nutrients and small-scale turbulence in a microcosm experiment. II. Dynamics of organic matter and phosphorous. *Aquatic Microbial Ecology* 29:63-72
- Mann KH & Lazier JRN (1991) Dynamics of marine ecosystems. Biological-physical interactions in the oceans. Blackwell Scientific publications, Boston 466p
- Marchal O, Monfray P & Bates NR (1996) Spring-summer imbalance of dissolved inorganic carbon in the mixed layer of the northwestern Sargasso Sea. *Tellus* 48:115-134
- Margalef R (1978) Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1:493-509
- Mari X & Kiørboe T (1996) Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *Journal of Plankton Research* 18:969-986
- Mari X (1997) Distribution saisonnière des Particules Exopolymériques Transparentes en eau côtière (Kattegat). Conséquences potentielles dans la chaîne trophique et les flux de matière. Thèse de Doctorat, Université Paris VI, 170p
- Mari X & Burd A (1998) Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Marine Ecology Progress Series* 163:63-76
- Mari X (1999) Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric transparent particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 183:59-71
- Mari X, Beauvais S, Lemée R & Pedrotti ML (2001) Non-Redfield C:N ratio of Transparent Exopolymeric Particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* 46:1831-1836
- Martin JH (1992) Iron as a limiting factor in oceanic productivity. In: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. PG Falkowski and AD Woodhead (ed.) Plenum New York city. 123-137
- Martin JH, Fitzwater SE, Gordon RM, Hunter CN & Tanner SJ (1993) Iron, primary production and carbon-nitrogen flux studies during the JGOFS North Atlantic Bloom Experiment. *Deep-Sea Research* 40:115-134

- Marty JC, Nicolas E, Miquel J & Fowler SW (1994) Particulate flux of organic compounds and their relationship to zooplankton fecal pellets in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 46:387-405
- Marty JC & Chiavérini J (2002) Seasonal and interannual variations in phytoplankton production at DYFAMED time-series station, northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research II* 49:2017-2030
- Marty JC, Chiavérini J, Pizay MD & Avril B (2002) Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED time-series station (1991-1999). *Deep-Sea Research* 49:1965-1985
- Mc Cave IN (1984) Size spectra and aggregation of suspended particles in the deep ocean. *Deep-Sea Research* 31:329-352
- Migon C, Sandroni V & Béthoux JP (2001) Atmospheric input of anthropogenic phosphorus to the northwest Mediterranean during the oligotrophic season. *Marine Environmental Research* 52:413-426
- Minas HJ, Minas M, Coste B, Gostan J, Nival P & Bonin MC (1988) Production de base et de recyclage; une revue de la problématique en méditerranée. *Oceanologica Acta* 9:155-162
- Miquel J, Fowler S, La Rosa J & Buat-Menard P (1994) Dynamics of the downward flux of particles and carbon in the open northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research* 41:243-261
- Miquel JC & La Rosa M (1999) Suivi à long terme des flux particuliers au site DYFAMED (Mer Ligure, Méditerranée occidentale). *Océanis* 25:303-308
- Moeseneder MM & Herndl GJ (1995) Influence of turbulence on bacterial production in the sea. *Limnology and Oceanography* 40:1466-1473
- Mopper K, Zhou J, Ramana KS, Passow U, Dam HG & Drapeau DT (1995) The role of surface-active carbohydrates in the flocculation of a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research* 42:47-73
- Morán XAG, Gasol JM, Arin L & Estrada M (1999) A comparison between glass fiber and membrane filters for the estimation of phytoplankton POC and DOC production. *Marine Ecology Progress Series* 187:31-41
- Moreira-Turcq PF & Martin JM (1998) Characterisation of fine particles by flow cytometry in estuarine and coastal Arctic waters. *Journal of Sea Research* 39:217-226
- Mostajir B, Fagerbakke KM, Heldal M, Thingstad TF & Rassoulzadegan F (1997) Elemental composition of individual pico- and nano-sized marine detrital particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Oceanologica Acta* 21:589-596
- Moutin T, Raimbault P & Poggiale JC (1999) Primary production in surface waters of the western Mediterranean sea. Calculation of daily production. *CR Académie des Sciences Paris, Life Sciences* 322:651-659
- Mozetic P, Fonda Umani S & Kamburska L (2002) Plankton variability in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Archiv Oceanography and Limnology* 23:7-19
- Murray AG (1995) Phytoplankton exudation: exploitation of the microbial loop as a defence against algal viruses. *Journal of Plankton Research* 17(5):1079-1094
- Myklestad S, Holm-Hansen O, Vaarum KM & Volcani BE (1989) Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *Journal of Plankton Research* 11:763-773
- Myklestad SM (1974) Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 15:261-274
- Myklestad SM (1995) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The total Environment* 165:155-164

- Nagata T (2000) Production mechanisms of dissolved organic matter. In: Microbial ecology of the oceans. DL Kirchman (ed.) Wiley-Liss New York. p121-152
- Nival P & Corre MC (1976) Variations annuelles des caractéristiques hydrologiques de surface dans la rade de Villefranche-sur-mer. *Annales de l'institut Océanographiques* 52:57-78
- Niven SEH, Kepkay PE & Bugden JBC (1997) The role of TEP in the ^{234}Th scavenging during a coastal diatom bloom. *Radioprotection-Colloques*. 32: 213-218
- Nolting RF (1986) Copper, zinc, cadmium, nickel, iron and manganese in the Southern bight of the North Sea. *Marine Pollution Bulletin* 17:113-117
- Norland S, Fagerbakke KM & Heldal M (1995) Light element analysis of individual bacteria by X-ray microanalysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1357-1362
- Norrman B, Zweifel UL, Hopkinson CS & Fry B (1995) Production and utilization of dissolved organic carbon during an experimental diatom bloom. *Limnology and Oceanography* 40:898-907
- Obernosterer I & Herndl GJ (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series* 116:247-257
- Parker CB & Diboll AG (1966) Alcian Stains for Histochemical Localization of Acid and Sulfated Polysaccharides in Algae. *Phycologia* 6:38-46
- Passow U & Alldredge AL (1994) Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Marine Ecology Progress Series* 113:185-198
- Passow U & Alldredge AL (1995a) Aggregation of a diatom bloom in a mesocosm: The role of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep Sea Research II* 42:99-109
- Passow U & Alldredge AL (1995b) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymeric particles (TEP). *Limnology and Oceanography* 40:1326-1335
- Passow U (2000) Formation of transparent exopolymeric particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology Progress Series* 192:1-11
- Passow U, Shipe RF, Murray A, Pak DK, Brzezinski MA & Alldredge A (2001) The origin of transparent exopolymeric particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research* 21:327-346
- Passow U (2002a) Production of transparent exopolymeric particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series* 236:1-12
- Passow U (2002b) Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography* 55:287-333
- Pätsch J & Radach G (1997) Long-term simulation of the eutrophication of the North Sea: temporal development of nutrients, chlorophyll and primary production in comparison to observations. *Journal of Sea Research* 38:275-310
- Penna A, Berluti S, Penna N & Magnani M (1999) Influence of nutrient ratios on the *in vitro* extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research* 21:1681-1690
- Peters F & Redondo JM (1997) Turbulence generation and measurement: application to studies on plankton. *Scientia Marina* 61:205-228
- Peters F & Marrasé C (2000) Effects of turbulence on plankton: an overview of experimental evidence and some theoretical considerations. *Marine Ecology Progress Series* 205:291-306
- Ploug H & Grossart HP (1999) Bacterial production and respiration in suspended aggregates-a matter of the incubation method. *Aquatic Microbial Ecology* 20:21-29
- Porter KG & Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-948

- Prieto L, Ruiz J, Echevarria F, Garcia CM, Bartual A, Galvez JA, Corzo A & Macias D (2002) Scales and processes in the aggregation of diatom blooms: high time resolution and wide size range records in a mesocosm study. *Deep-Sea Research I* 49:1233-1253
- Radach G (1992) Ecosystem functioning in the German Bight under continental nutrient inputs by rivers. *Estuaries* 15:477-496
- Ramaiah N, Yoshikawa T & K. F (2001) Temporal variations in transparent exopolymeric particles (TEP) associated with a diatom spring bloom in a subarctic ria in Japan. *Marine Ecology Progress Series* 212:79-88
- Ramus J (1977) Alcian Blue: A quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides. *Journal of Phycology* 13:345-348
- Rassoulzadegan F (1993) Protozoan patterns in the Azam-Ammerman's bacteria-phytoplankton mutualism. In: *Trends in microbial ecology*. (ed.) Spanish Society for Microbiology Barcelona. p435-439
- Redfield AC, Ketchum BH & Richards FA (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: *The sea*. MN Hill (ed.) Vol.2, John Wiley & Sons 26-77
- Richardson LF (1922) *Weather prediction by numerical process*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ridame C & Guieu C (2002) Saharan input of phosphorus to the oligotrophic water of the open western Mediterranean. *Limnology and Oceanography* 47:856-869
- Riebesell U, Reigstad M, Wassmann P, Noji TT & Passow U (1995) On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot): VI. Significance of *Phaeocystis*-derived mucus for vertical flux. *Netherlands Journal of Sea Research* 33:193-203
- Riley GA (1963) Organic Aggregates in seawater and the dynamics of their formation and utilization. *Limnology and Oceanography* 8:372-381
- Rothschild BJ & Osborn TR (1988) Small-scale turbulence and plankton contact rates. *Journal of Plankton Research* 10:465-474
- Ryther JH (1969) Photosynthesis and fish production in the sea: the production of organic matter and its conversion to higher forms of life vary throughout the world ocean. *Science* 166:72-76
- Saager PM, De Baar HJW, De Jong JTM, Nolting RF & Schijf J (1997) Hydrography and local sources of dissolved trace metals, Mn, Ni, Cu and Cd in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 57:195-216
- Sala MM, Peters F, Gasol JM, Pedros-Alio C, Marrasé C & Vaqué D (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 27:47-56
- Sambrotto RN, Savidge G, Robinson C, Boyd P, Takahashi T, Karl DM, Langdon C, Chipman D, Marra J & Codispoti L (1993) Elevated consumption of carbon relative to nitrogen in the surface ocean. *Nature* 363:248-250
- Sambrotto RN & Langdon C (1994) Water column dynamics of dissolved inorganic carbon (DIC), nitrogen and O₂ on Georges Bank during April, 1990. *Continental Shelf Research* 14:765-789
- Sarthou G & Jeandel C (2001) Seasonal variations of iron concentrations in the Ligurian Sea and iron budget in the Western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 74:115-129
- Schoemann V, De Baar HJW, De Jong JTM & Lancelot C (1998) Effects of phytoplankton blooms on the cycling of manganese and iron in coastal waters. *Limnology and Oceanography* 43:1427-1441
- Schoemann V (2000) On the role of *Phaeocystis* sp. in the biogeochemical cycles of manganese and iron. Ph.D.thesis, Université Libre de Bruxelles.,

- Schoemann V, Wollast R, Chou L & Lancelot C (2001) Effects of photosynthesis on the accumulation of Mn and Fe by *Phaeocystis* colonies. *Limnology and Oceanography* 46:1065-1076
- Schumann R & Rentsch D (1998) Staining particulate organic matter with DTAF- a fluorescence dye for carbohydrates and protein: a new approach and application of a 2D image analysis system. *Marine Ecology Progress Series* 163:77-88
- Schuster S & Herndl GJ (1995) Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124:227-236
- Schuster S, Arrieta JM & Herndl GJ (1998) Adsorption of dissolved free amino acids on colloidal DOM enhances colloidal DOM utilization but reduces amino acid uptake by orders of magnitude in marine bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series* 166:99-108
- Sciandra A, Gostan J, Collos Y, Descolas-Gros C, Leboulanger C, Martin-Jézéquel V, Denis M, Lefèvre D, Copin-Montégut C & Avril B (1997) Growth-compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnology and Oceanography* 42(6):1325-1339
- Scott JE & Dorling J (1965) Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian Blue in salt solutions. *Histochemie* 5:221-233
- Sempère R, Yoro SC, Van Wambeke F & Charrière B (2000) Microbial decomposition of large organic particles in the northwestern Mediterranean Sea: an experimental approach. *Marine Ecology Progress Series* 198:61-72
- Sheldon RW, Prakash A & Sutcliffe Jr. WH (1972) The size distribution of particles in the ocean. *Limnology and Oceanography* 17:327-340
- Sherrer B (1984) Biostatistique. Gaëtan Morin éditeur, Québec, Canada 850p
- Shimeta J (1993) Diffusional encounter of submicrometer particles and small cells by suspension feeders. *Limnology and Oceanography* 38:456-465
- Smith DC, Simon M, Alldredge AL & Azam F (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359:139-141
- Smith DC, Steward GF, Long RA & Azam F (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research II* 42:75-97
- Solomon CM, Lessard EJ, Keil RG & Foy MS (2003) Characterization of extracellular polymers of *Phaeocystis globosa* and *P. antarctica*. *Marine Ecology Progress Series* 250:81-89
- Søndergaard M & Middelboe M (1993) Measurement of particulate organic carbon: a note on the use of glass fiber (GF/F) and Anodisc filters. *Hydrobiology* 127:73-85
- Sournia A, Brylinski JM, Dallot S, Le Corre P, Leveau M, Prieur L & Forget C (1990) Fronts hydrologiques au large des côtes françaises : les sites ateliers du programme Frontal. *Oceanologica Acta* 9:119-131
- Stiansen JE (2001) Small-scale turbulence in relation to plankton ecology: Sources, Measurements and Analysis-with focus on energy dissipation rates and turbulent scales. PhD Thesis, Université de Bergen,
- Stoderegger KE & Herndl GJ (1999) Production of exopolymeric particles by marine bacterioplankton under contrasting turbulence conditions. *Marine Ecology Progress Series* 189:9-16
- Sueur S, Van den Berg CMG & Riley JP (1982) Measurement of the metal complexing ability of exudates of marine macroalgae. *Limnology and Oceanography* 27:536-543
- Svendsen H (1997) Physical oceanography and marine ecosystems: Some illustrative examples. *Scientia Marina* 61:93-108
- Taylor LR (1961) Aggregation, variance and the mean. *Nature* 189:732-735

- Thingstad TF & Rassoulzadegan F (1995) Nutrient limitations, microbial food webs, and "biological C-pumps": suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 117:299-306
- Thingstad TF, Hagström A & Rassoulzadegan F (1997) Accumulation of degradable DOC in surface waters: It is caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnology and Oceanography* 42:398-404
- Thingstad TF, Pérez MT, Pelegri S, Dolan JR & Rassoulzadegan F (1999) Trophic control of bacterial growth in microcosms containing a natural community from northwest Mediterranean surface waters. *Aquatic Microbial Ecology* 18:145-156
- Thornton DC, Santillo D & Thake B (1999) Prediction of sporadic mucilaginous algal blooms on the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 38:891-898
- Toggweiler JR (1993) Carbon overconsumption. *Nature* 363:210-211
- Tranvik LJ, Sherr EB & Sherr BF (1993) Uptake and utilization of 'colloidal DOM' by heterotrophic flagellates in seawater. *Marine Ecology Progress Series* 92:301-309
- Tréguer P & Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'AutoAnalyzer Technicon^a).
- Van den Berg CMG (1995) Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Marine Chemistry* 50:139-157
- Van der Zee C, Van Raaphorst W, Helder W & De Heij H (2003) Manganese diagenesis in temporal and permanent depositional areas of the north Sea. *Continental Shelf Research* 23:625-646
- Van Wambeke F, Christaki U, Giannakourou A, Moutin T & Souvemerzoglou K (2002a) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* 43:119-133
- Van Wambeke F, Heussner S, Diaz F, Raimbault P & Conan P (2002b) Small-scale variability in the coupling/uncoupling of bacteria, phytoplankton and organic carbon fluxes along the continental margin of the Gulf of Lions, Northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems* 33-34:411-429
- Vanni M & Baldi G (2002) Coagulation efficiency of colloidal particles in shear flow. *Advances in colloid and interface science* 97:151-177
- Vasconcelos MTSD, Leal MFC & Van den Berg CMG (2001) Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Marine Chemistry* 77:187-210
- Vidussi F, Claustre H, Bustillos-Guzman J, Cailliau C & Marty J (1996) Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* 18:2377-2382
- Vrede K, Heldal M, Norland S & Bratbak G (2002) Elemental composition (C,N,P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2965-2971
- Wells ML & Goldberg ED (1991) Occurrence of small colloids in sea water. *Nature* 353:342-344
- Wells ML (1998) Marine colloids- A neglected dimension. *Nature* 391:530-531
- Wells ML, Smith GJ & Bruland KW (2000) The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay. *Marine Chemistry* 71:143-163
- Wiebe JW & Pomeroy LR (1972) Microorganisms and their association with aggregates and detritus in the sea: a microscopic study. *Proceedings of the IBP-UNESCO Symposium on Detritus and its role in aquatic ecosystems. Memorie. Inst. Ital. Idrobiol.*, 29: 325-352

- Williams PJleB (1995) Evidence for the seasonal accumulation of carbon-rich dissolved organic material, its scale in comparison with changes in particulate material and the consequential effect on net C:N assimilation ratios. *Marine Chemistry* 51:17-29
- Wu J & Luther GW (1994) Size-fractionated iron concentrations in the water column of the northwest Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* 39:1119-1129
- Wu J, Boyle E, Sunda W & Wen LS (2001) Soluble and colloidal Fe in the oligotrophic north Atlantic and north Pacific. *Science* 293:847-849
- Zavatarelli M, Raicich F, Bregant D, Russo A & Artegiani A (1998) Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems* 18:227-263
- Zavatarelli M, Baretta JW, Baretta-Bekker JG & Pinardi N (2000) The dynamics of the Adriatic Sea ecosystem. An idealized model study. *Deep-Sea Research* 47:937-970
- Zhou J, Mopper K & Passow U (1998) The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography* 43:1860-1871
- Zweifel UL, Norrman B & Hagström A (1993) Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Marine Ecology Progress Series* 101:23-32

Liste des annexes

Annexe A : p 177

♣ Spectres de taille des TEP, mises en évidence selon la méthode des lames blanches dépolies (LBD) et selon la méthode du filter-transfer-freeze (FTF ; Chapitre I).

Annexe B : p 191

♣ Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience (Chapitre III).

Annexe C : p 197

♣ Spectres de taille des TEP issues des expérimentations en mésocosmes (Chapitre IV).

Annexe D : p 207

♣ Colonisation bactérienne des TEP (Chapitre IV).

Annexe E : p 217

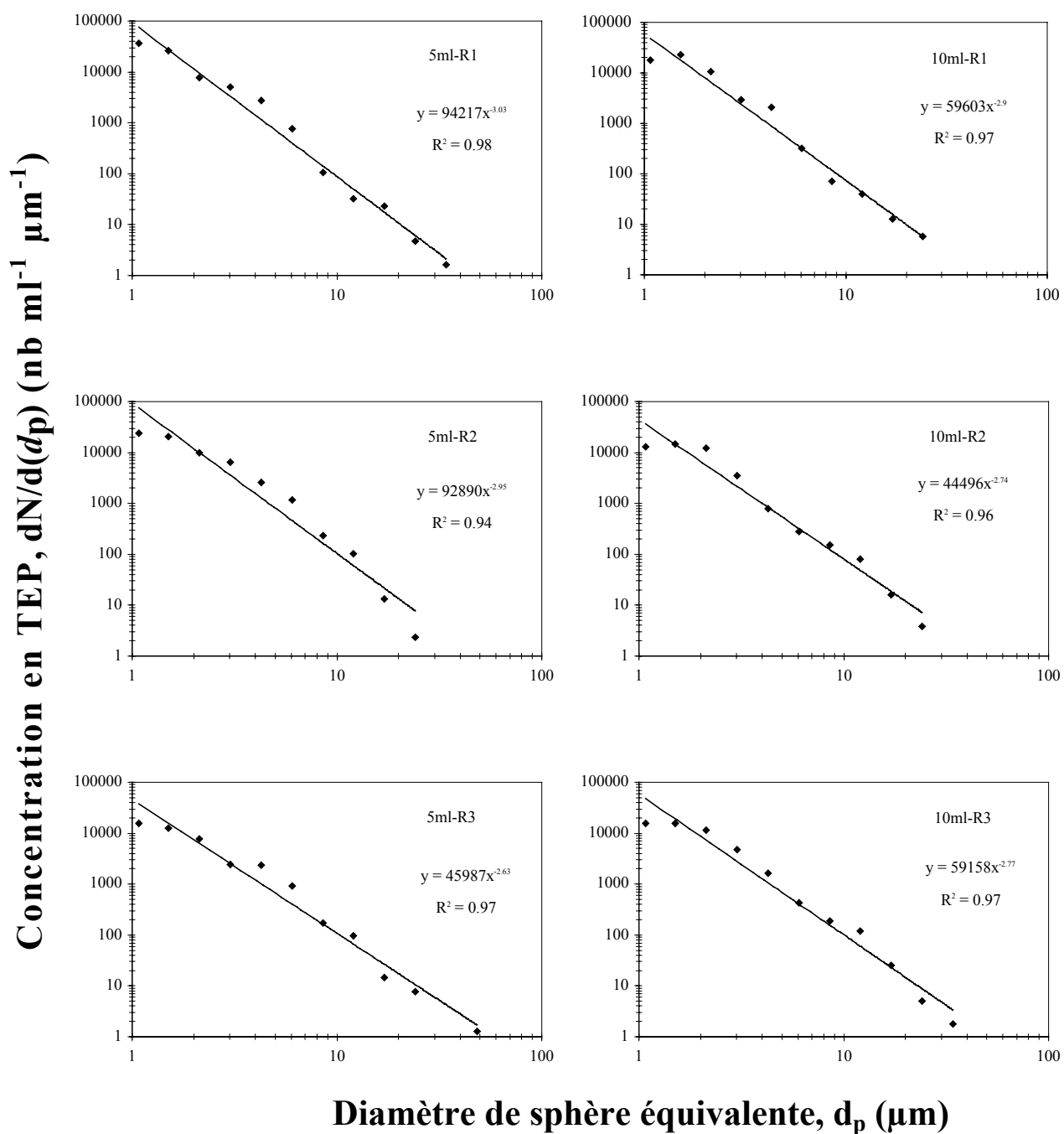
♣ Publications issues de ce travail de recherche.

Annexe A

♣ **Spectres de taille des TEP, mises en évidence selon la méthode des lames blanches dépolies (LBD) et selon la méthode du filter-transfer-freeze (FTF ; Chapitre I).**

SITE CÔTIER (TRIESTE)

Méthode des lames blanches dépolies (LBD)

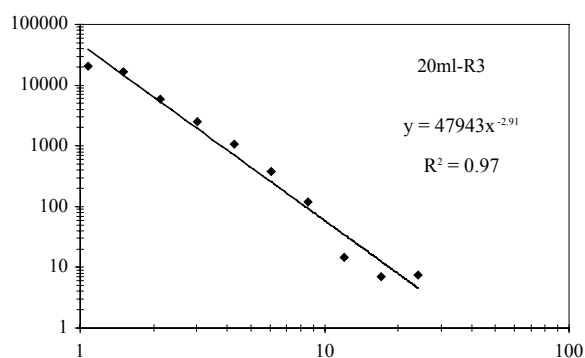
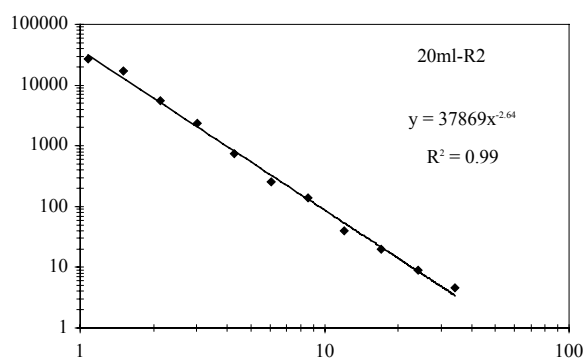
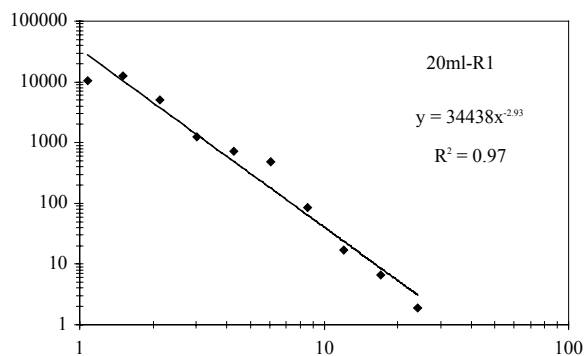


Annexe A1 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (5 ml à gauche, 10 ml à droite) ont été prélevés au site côtier (Trieste). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE CÔTIER (TRIESTE)

Méthode des lames blanches dépolies (LBD)

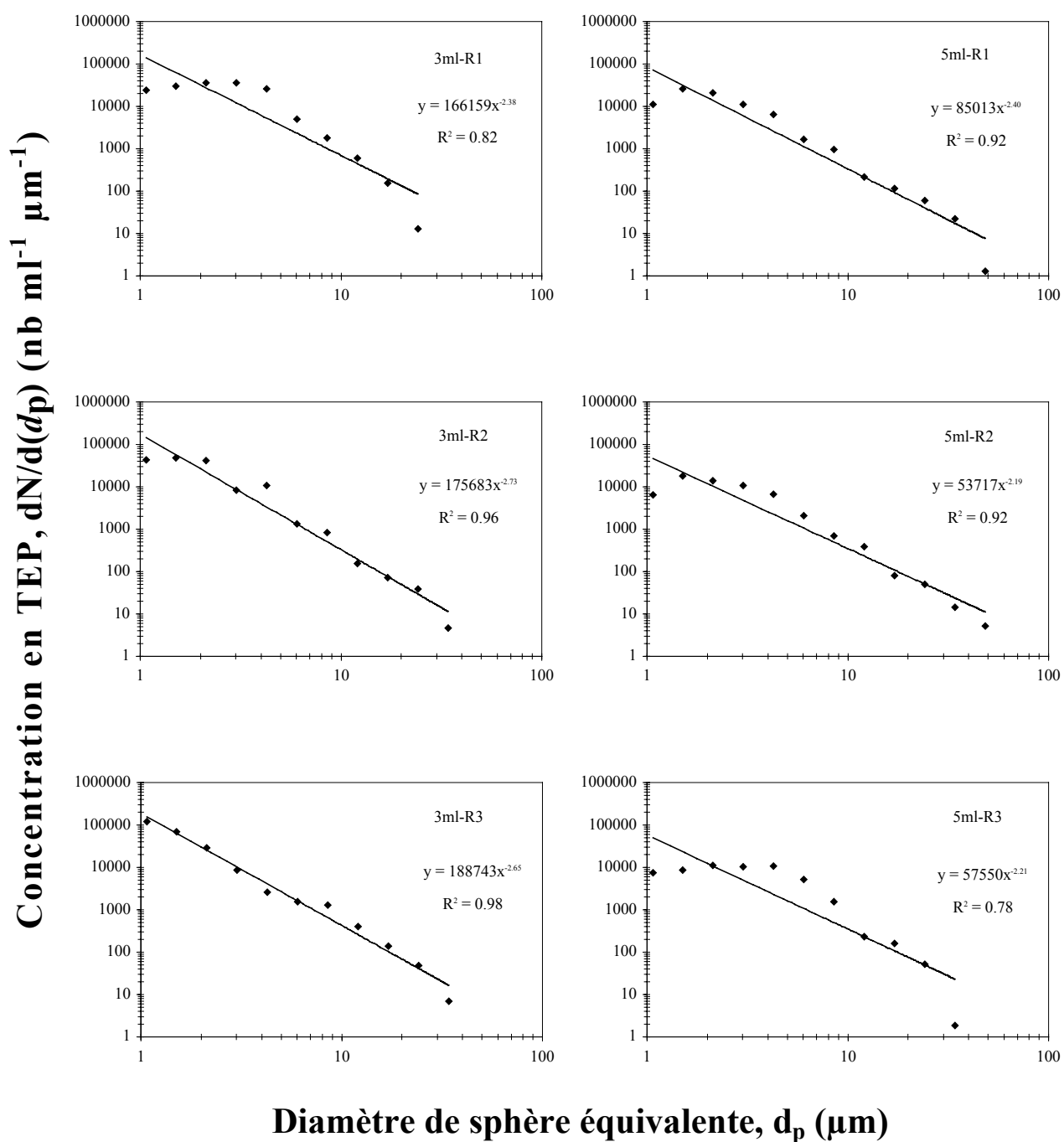
(suite)

Concentration en TEP, $dN/d(d_p)$ ($\text{nb ml}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$)Diamètre de sphère équivalente, d_p (μm)

Annexe A2 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (20 ml) ont été prélevés au site côtier (Trieste). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les répliquats.

SITE CÔTIER (TRIESTE)

Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)

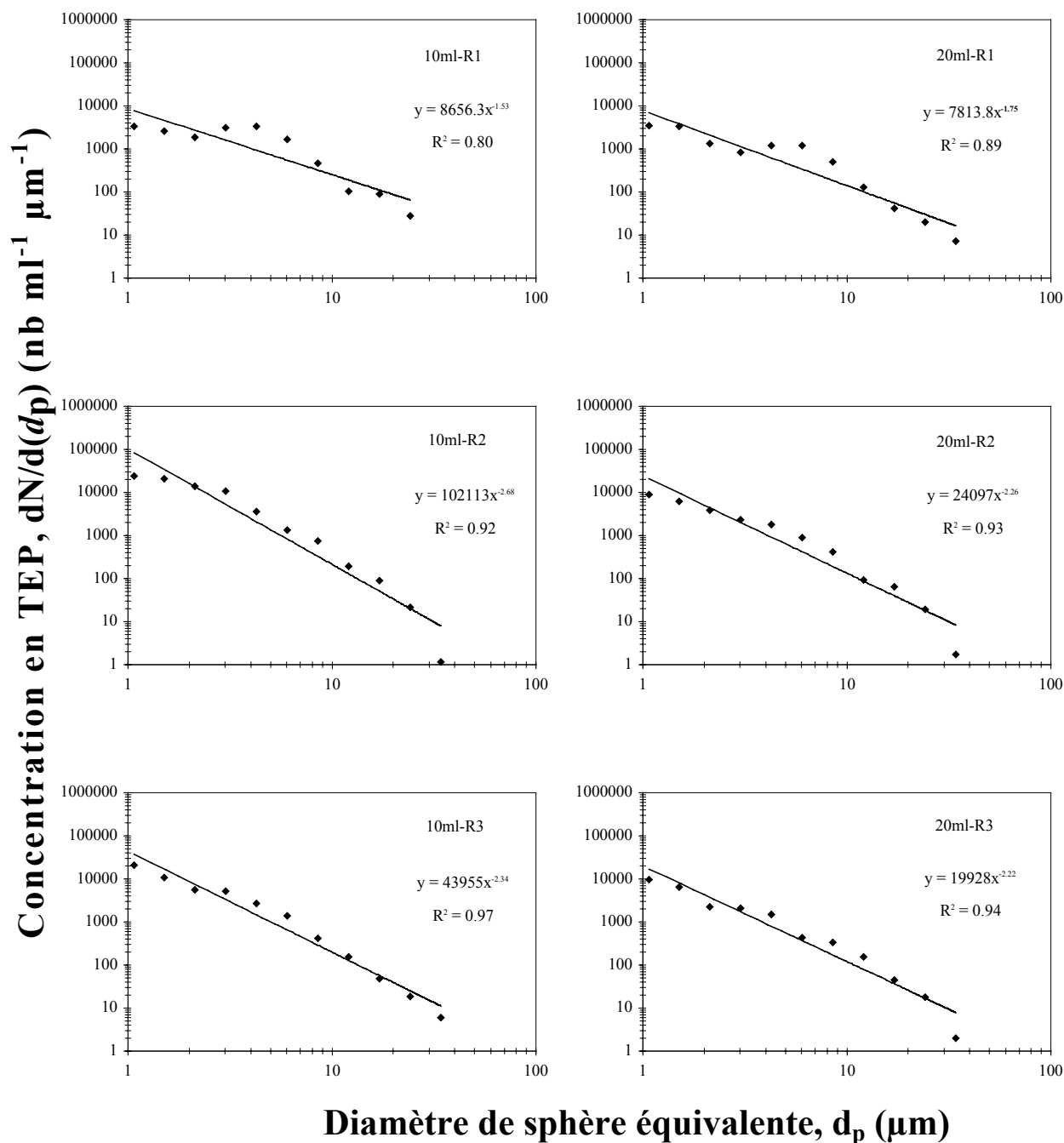


Annexe A3 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (3 ml à gauche, 5 ml à droite) ont été prélevés au site côtier (Trieste). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE CÔTIER (TRIESTE)

Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)

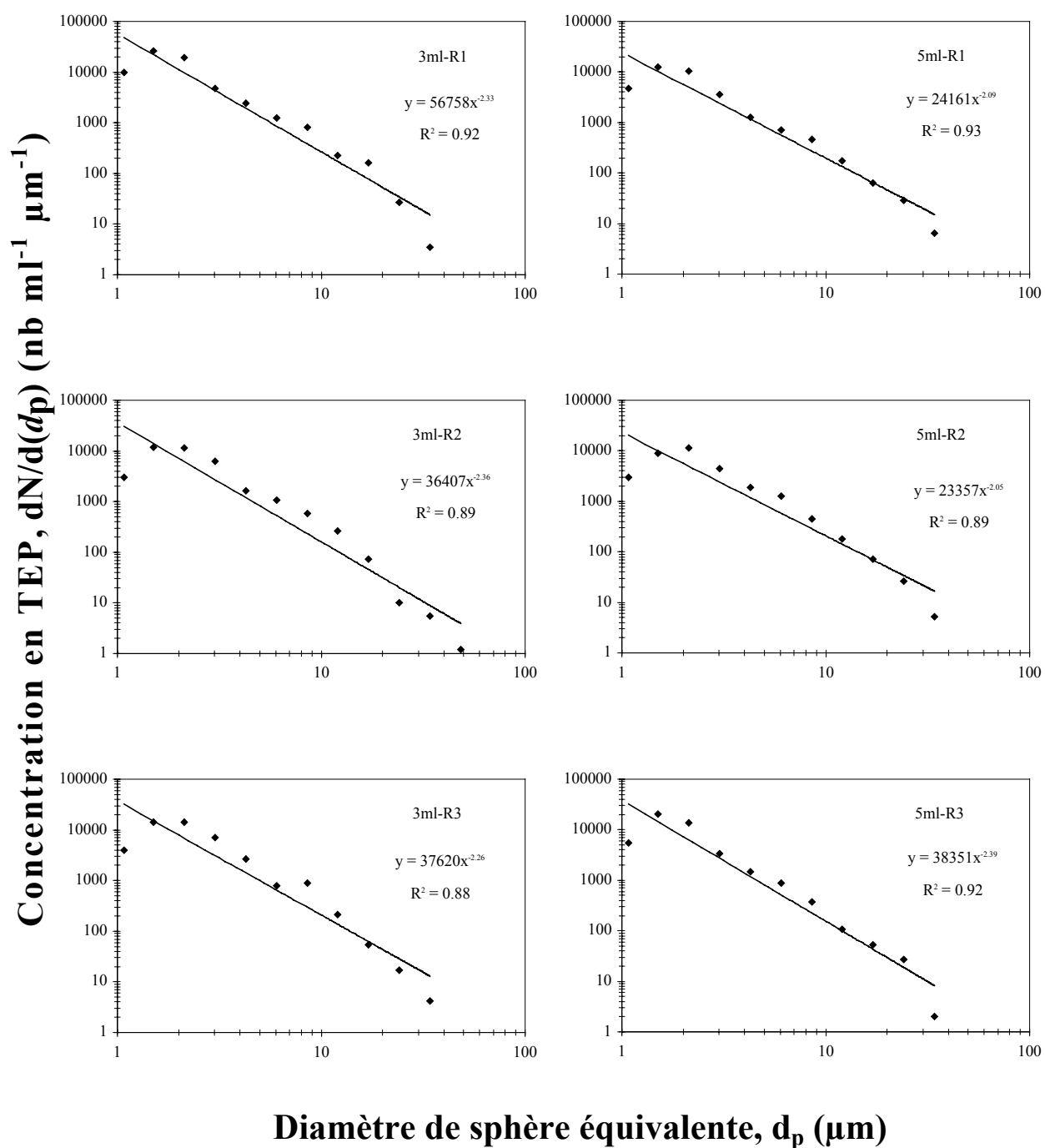
(suite)



Annexe A4 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (10 ml à gauche, 20 ml à droite) ont été prélevés au site côtier (Trieste). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE FJORD (Bergen)

Méthode des lames blanches dépolies (LBD)

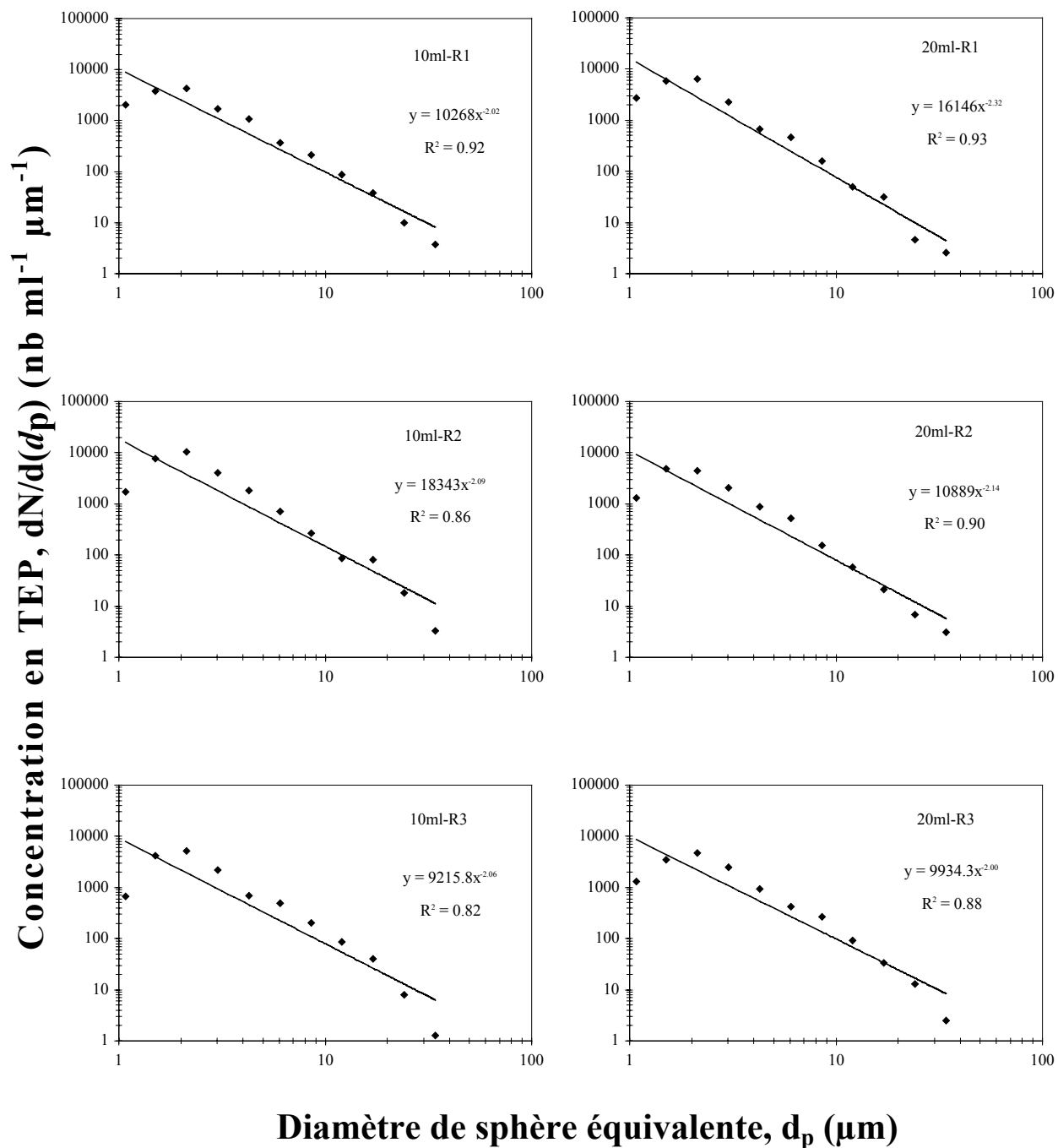


Annexe A5 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (3 ml à gauche, 5 ml à droite) ont été prélevés dans le Fjord (Bergen). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE FJORD (Bergen)

Méthode des lames blanches dépolies (LBD)

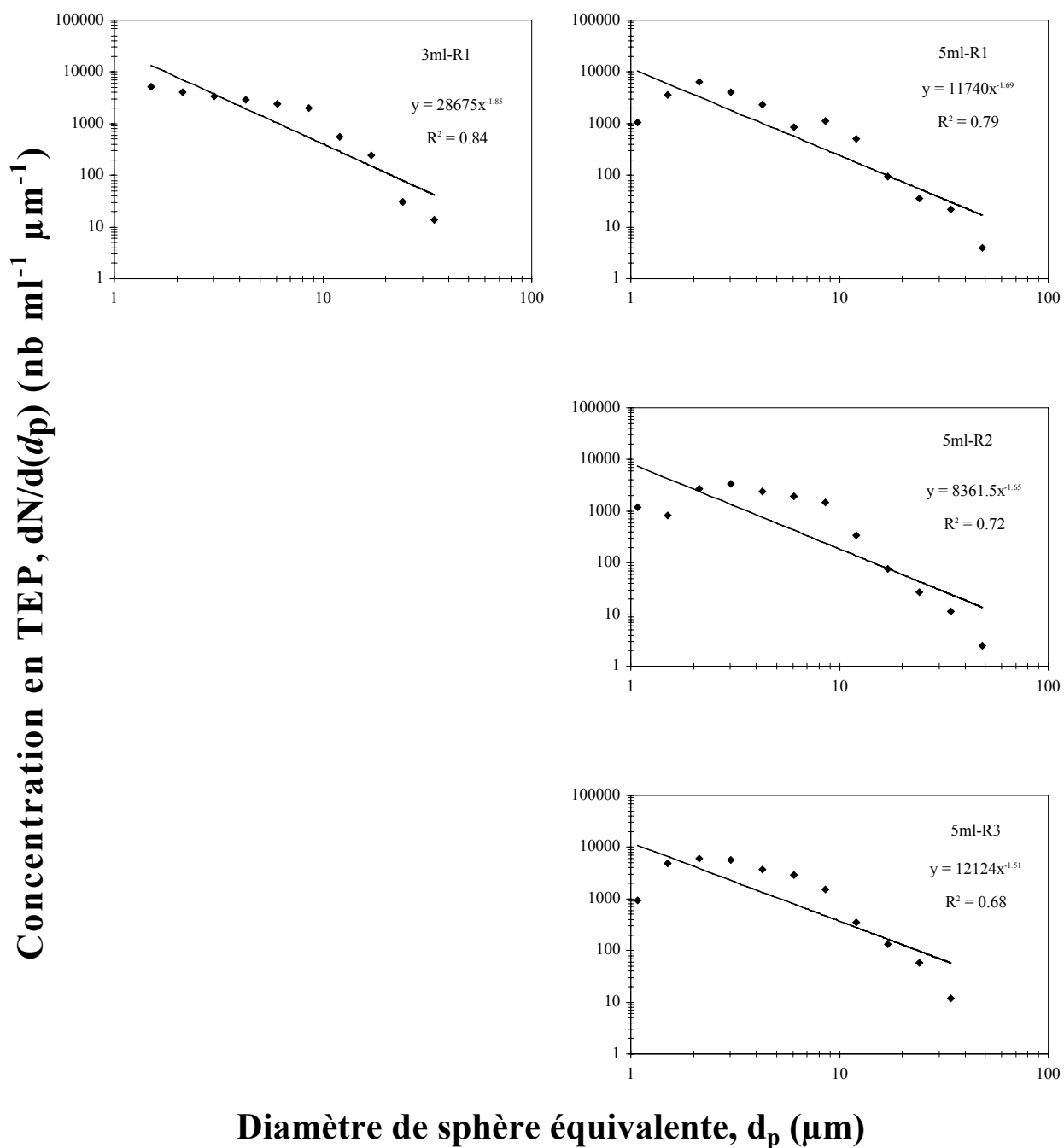
(suite)



Annexe A6 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (10 ml à gauche, 20 ml à droite) ont été prélevés dans le Fjord (Bergen). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE FJORD (Bergen)

Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)

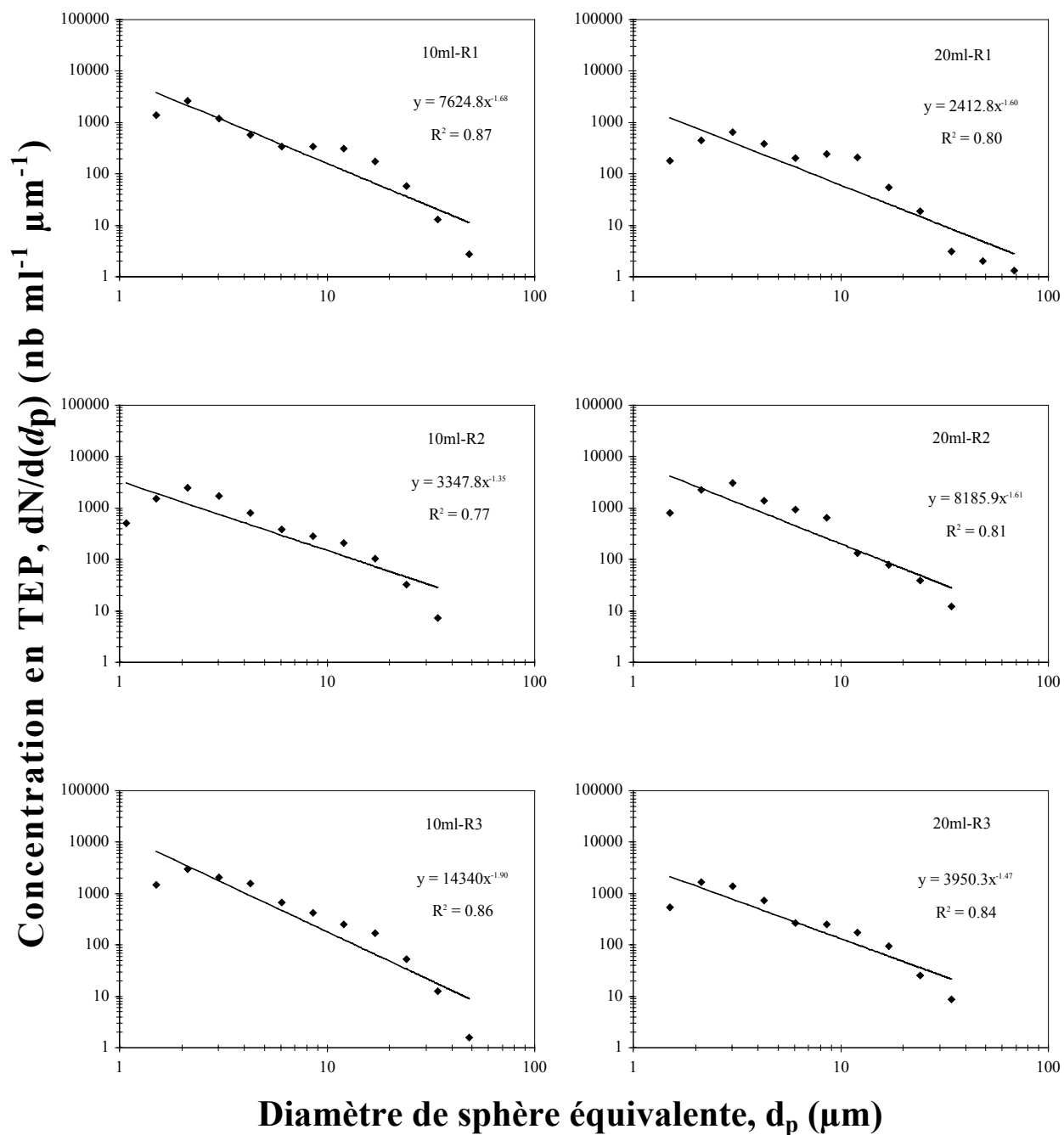


Annexe A7 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (3 ml à gauche, 5 ml à droite) ont été prélevés dans le Fjord (Bergen). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats. (absence de réplicats pour $V = 3ml$).

SITE FJORD (Bergen)

Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)

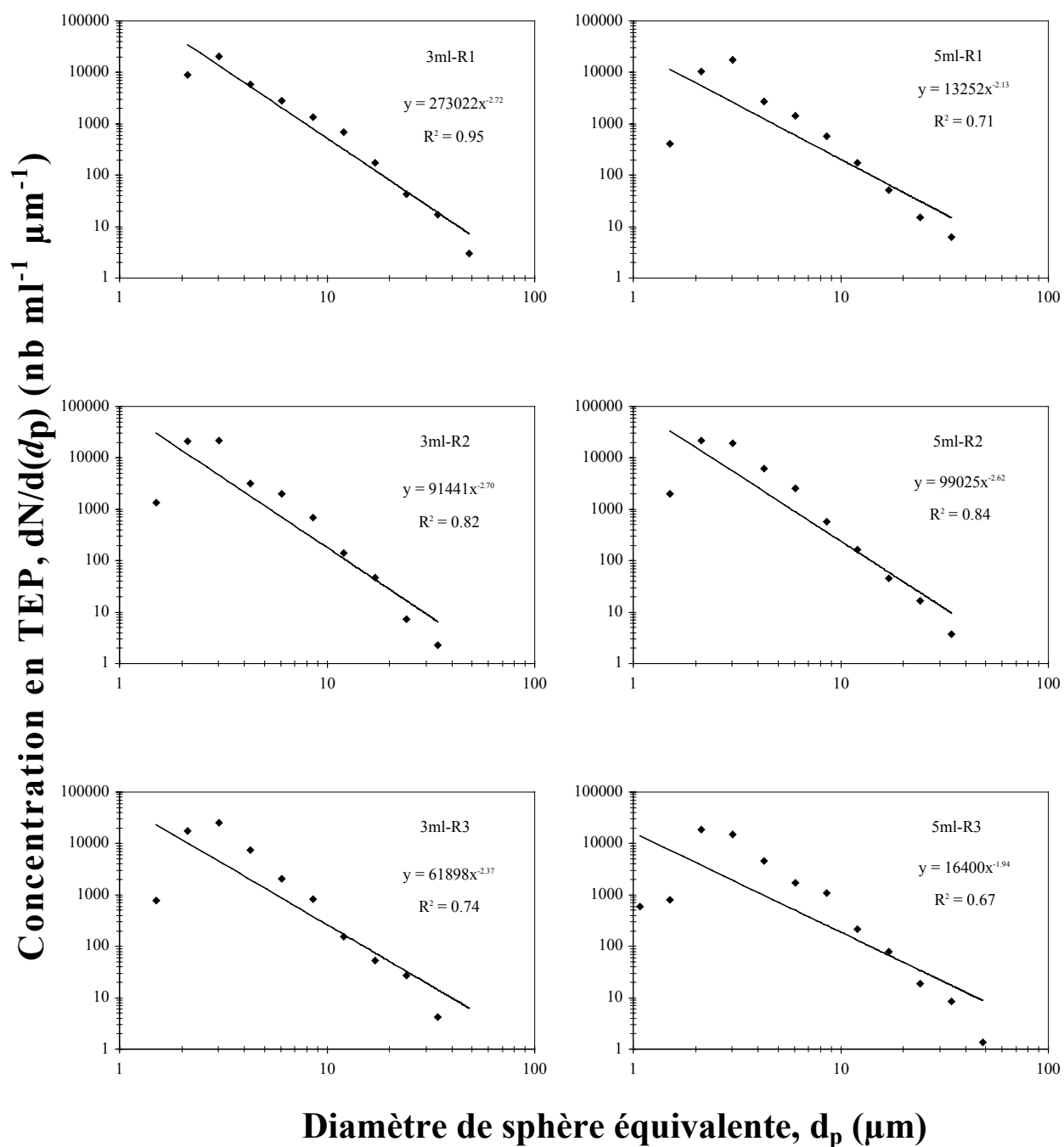
(suite)



Annexe A8 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (10 ml à gauche, 20 ml à droite) ont été prélevés dans le Fjord (Bergen). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE OCÉANIQUE (DYFAMED)

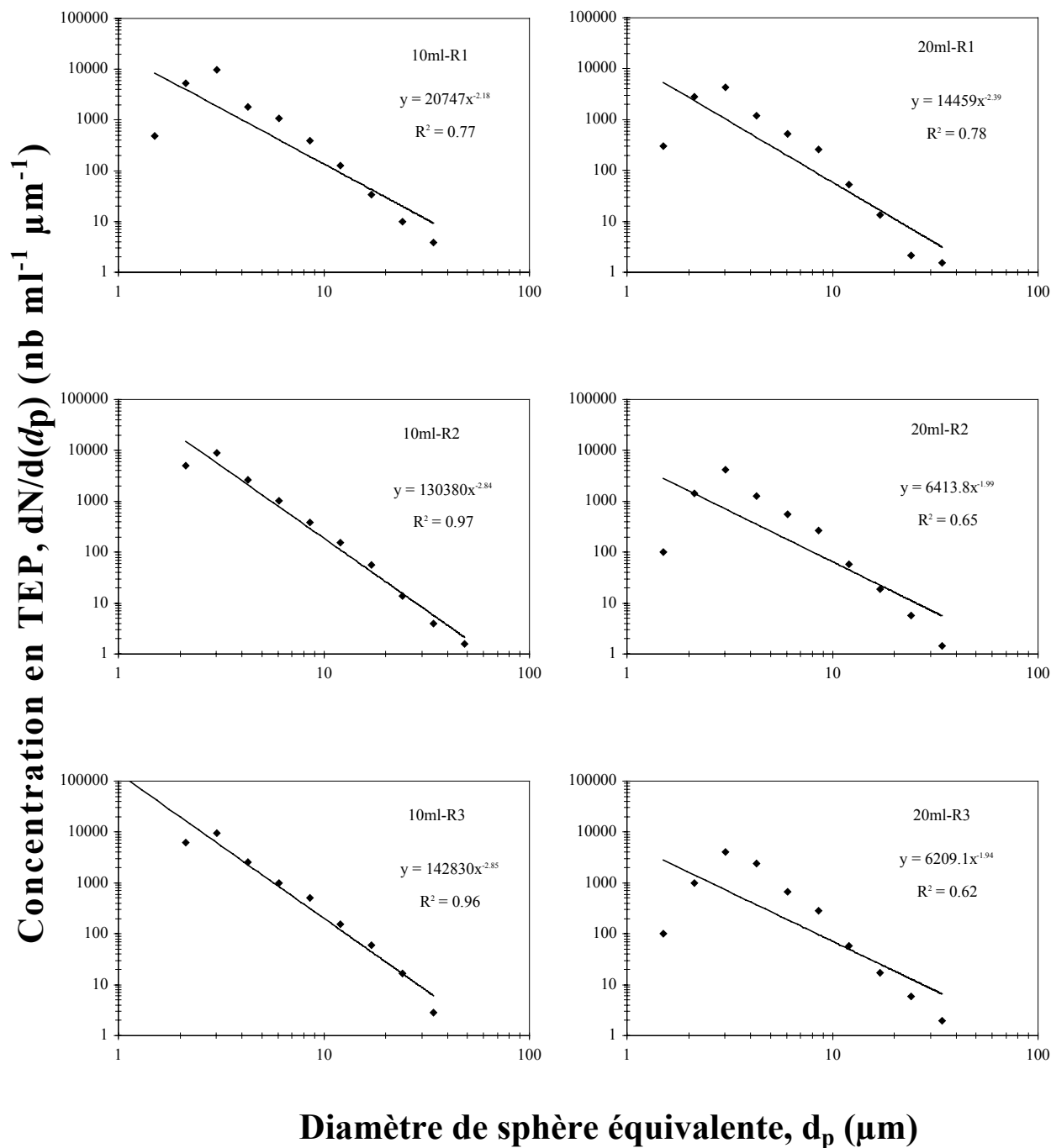
Méthode des lames blanches dépolies (LBD)



Annexe A9 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (3 ml à gauche, 5 ml à droite) ont été prélevés au site océanique (DYFAMED). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE OCÉANIQUE (DYFAMED)
Méthode des lames blanches dépolies (LBD)

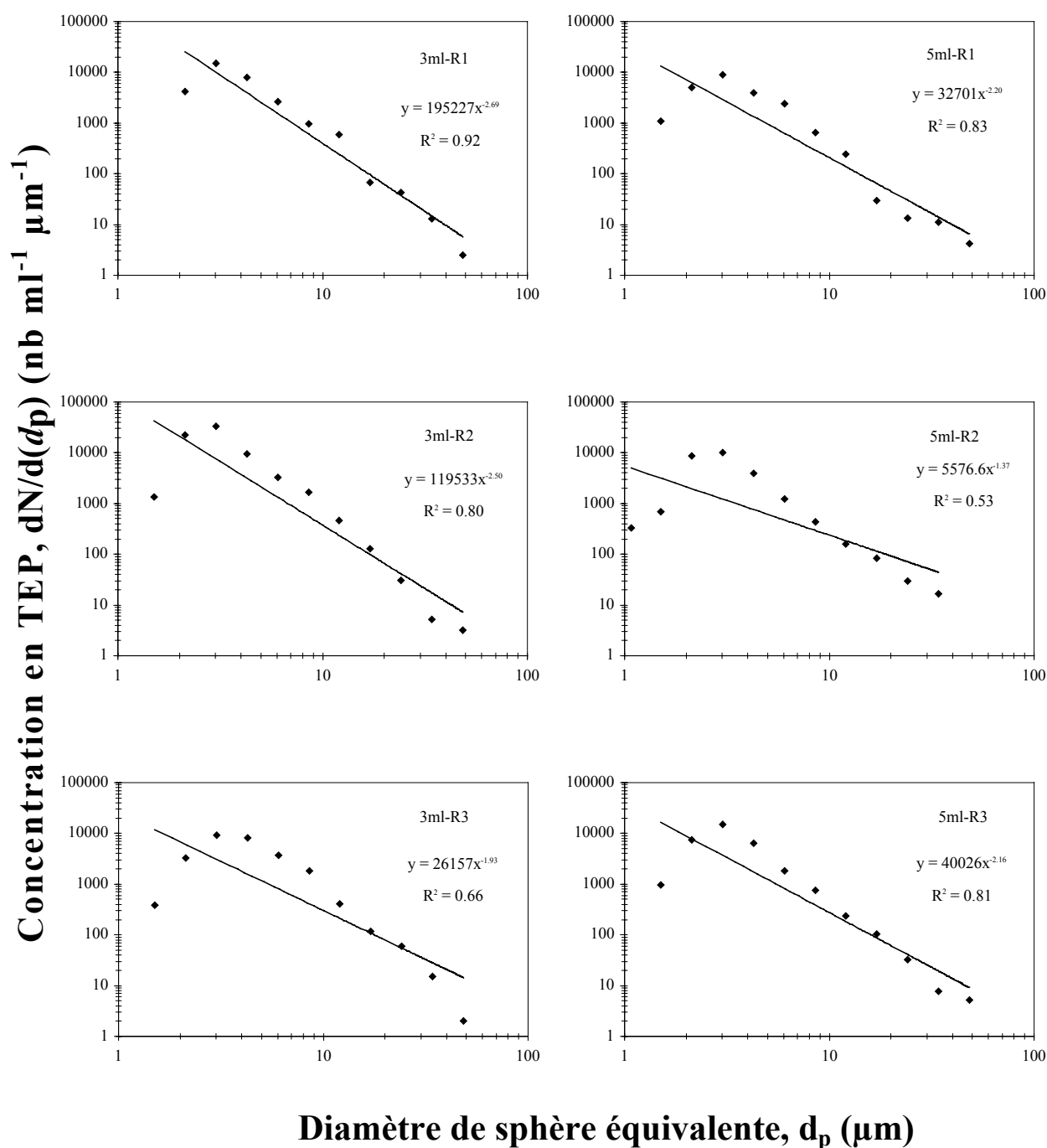
(suite)



Annexe A10: Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode des lames blanches dépolies (LBD). Les échantillons (10 ml à gauche, 20 ml à droite) ont été prélevés au site océanique (DYFAMED). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE OCEANIQUE (DYFAMED)

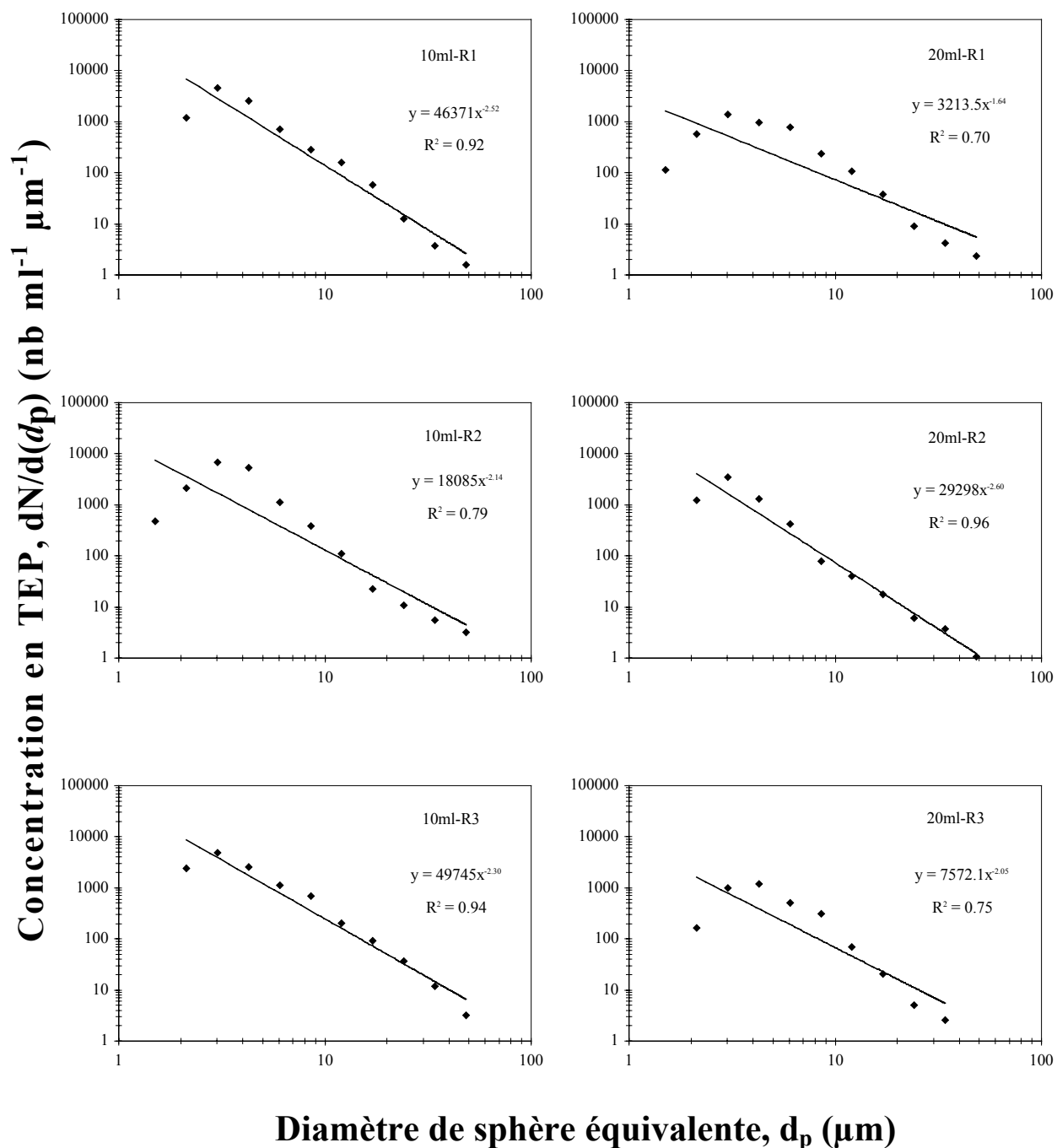
Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)



Annexe A11 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (3 ml à gauche, 5 ml à droite) ont été prélevés au site océanique (DYFAMED). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

SITE OCEANIQUE (DYFAMED)
Méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF)

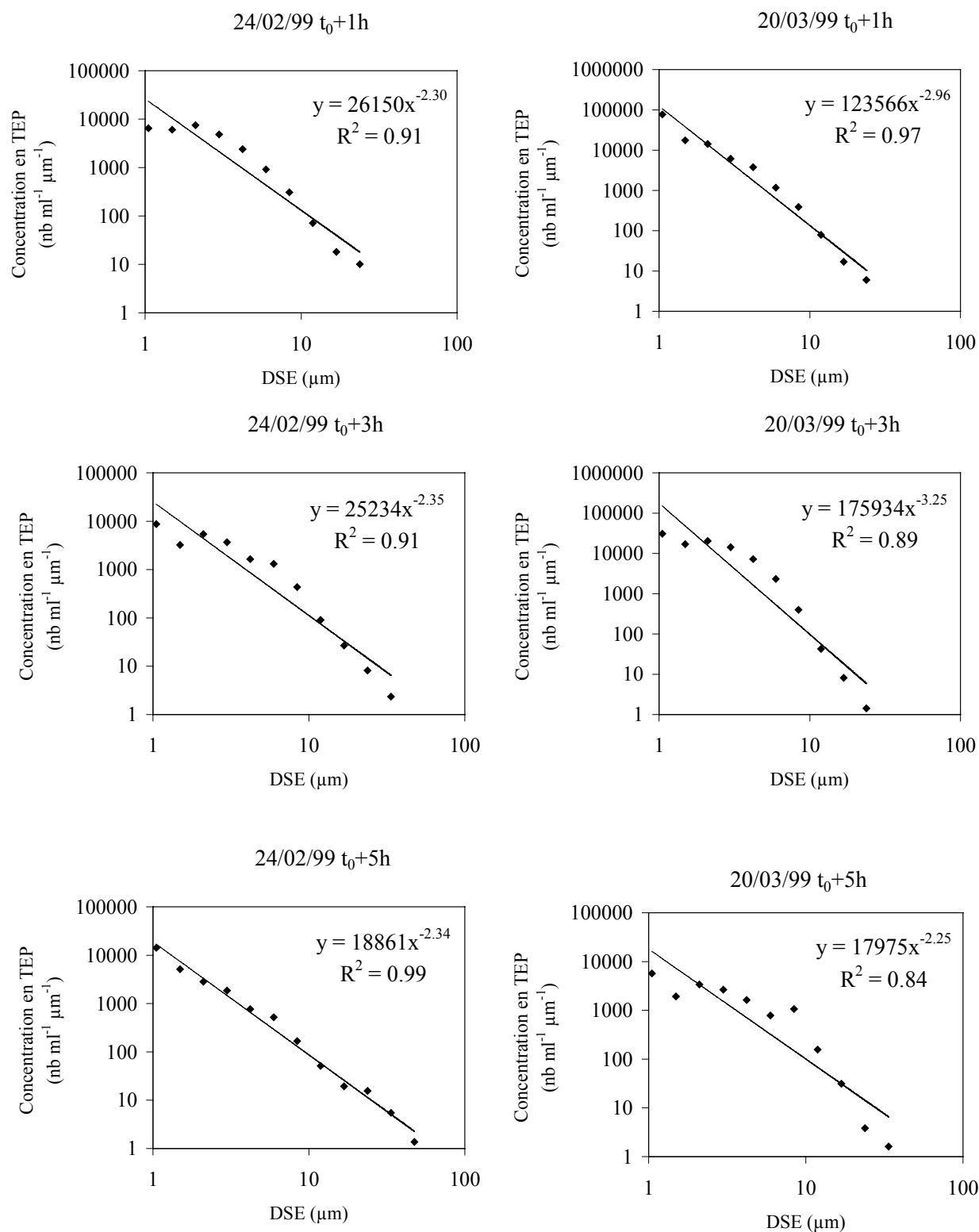
(suite)



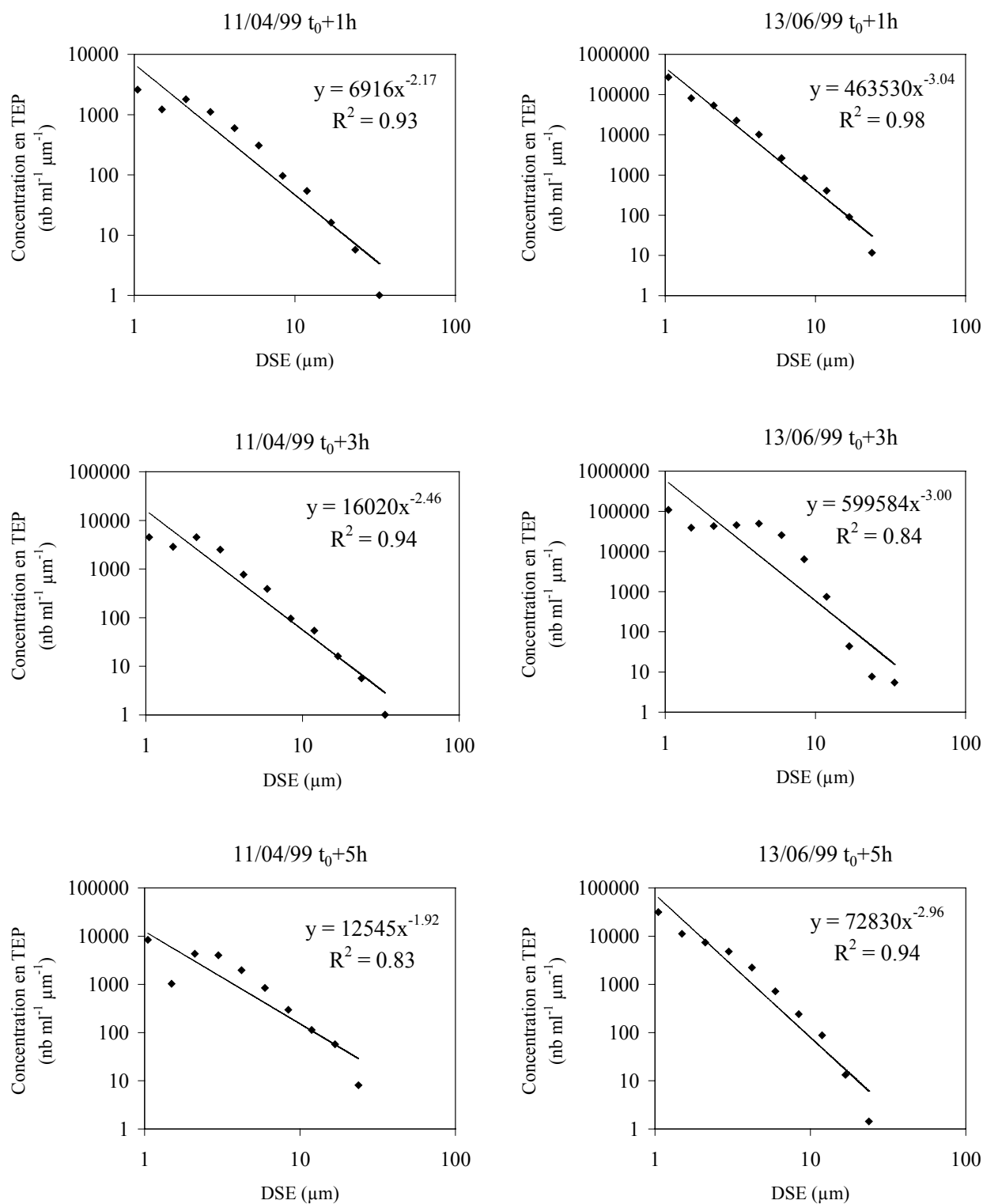
Annexe A12 : Spectres de taille des TEP, mises en évidence avec la méthode du « Filter-Transfer-Freeze » (FTF). Les échantillons (10 ml à gauche, 20 ml à droite) ont été prélevés au site océanique (DYFAMED). Les abscisses et les ordonnées sont représentées en échelle logarithmique. R1, R2, R3 définissent les réplicats.

Annexe B

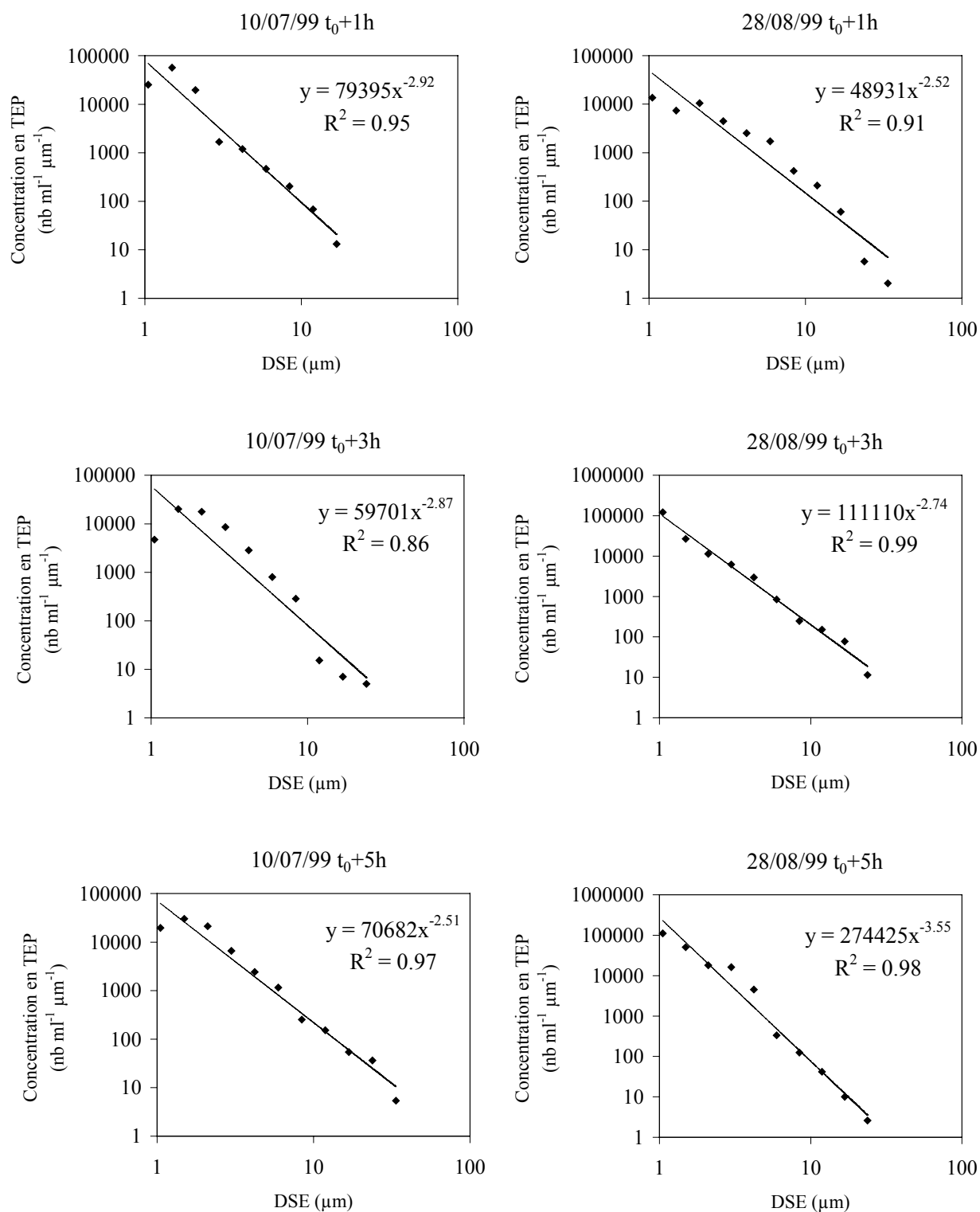
♣ **Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience (Chapitre III).**



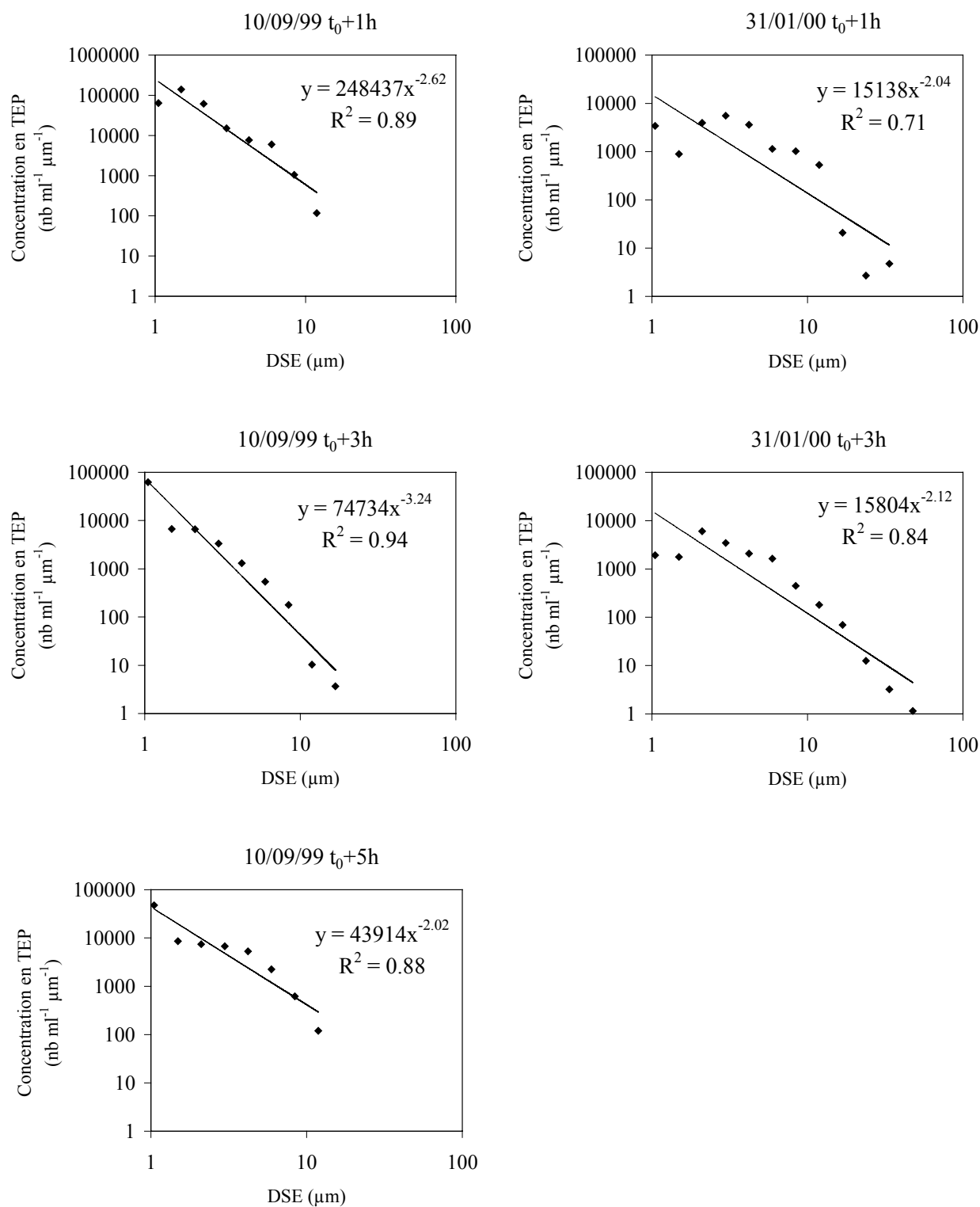
Annexe B1 : Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience. L'eau de mer utilisée pour former les TEP a été échantillonnée à DYFAMED en février et mars 1999.



Annexe B2 : Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience. L'eau de mer utilisée pour former les TEP a été échantillonnée à DYFAMED en avril et juin 1999.



Annexe B3 : Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience. L'eau de mer utilisée pour former les TEP a été échantillonnée à DYFAMED en juillet et août 1999.



Annexe B4 : Spectres de taille des TEP issues de la colonne de bullage, pour différentes durées d'expérience. L'eau de mer utilisée pour former les TEP a été échantillonnée à DYFAMED en septembre 1999 et en janvier 2000.

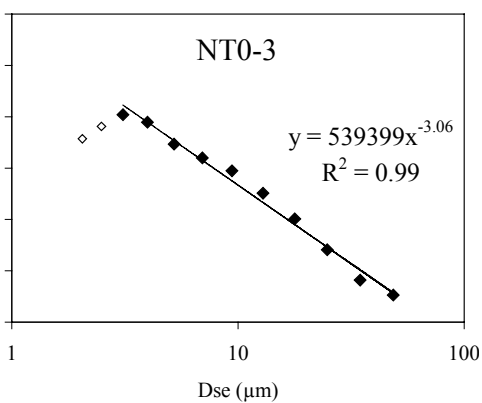
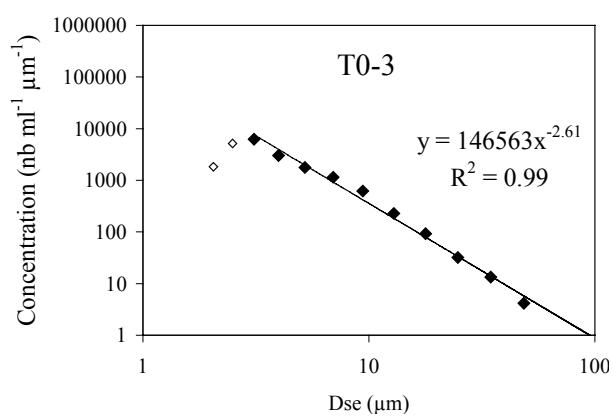
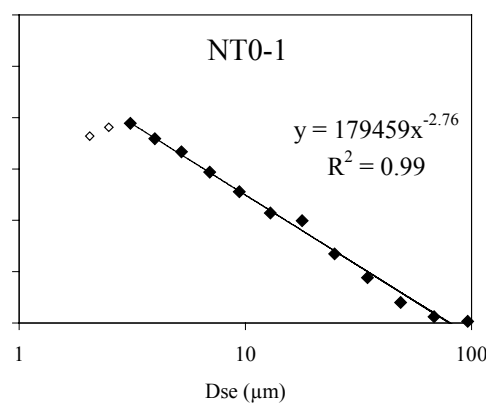
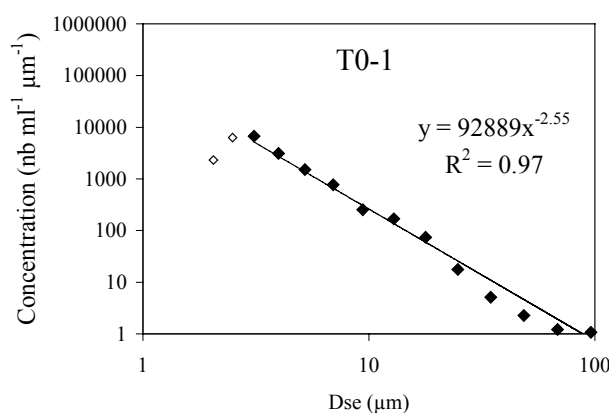
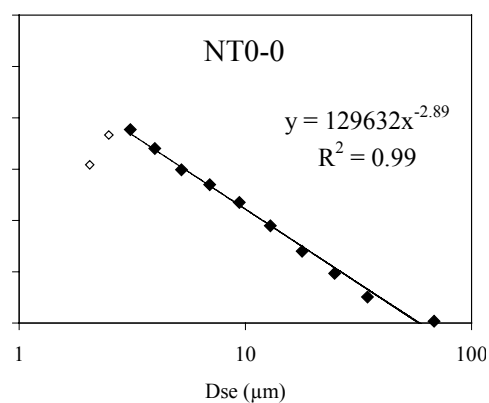
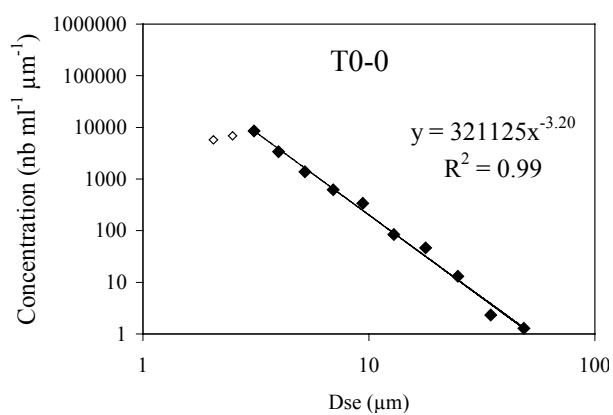
Annexe C

♣ Spectres de taille des TEP issues des expérimentations en mésocosmes (Chapitre IV).

Mésocosmes sans turbulence

Sans sels nutritifs (T0)

Avec sels nutritifs (NT0)

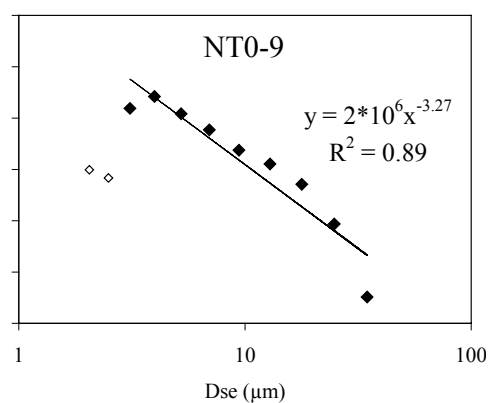
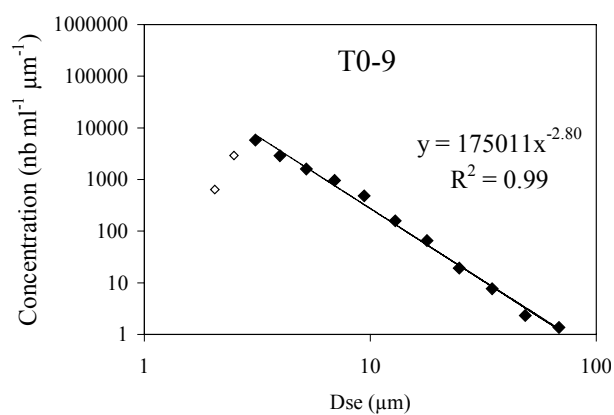
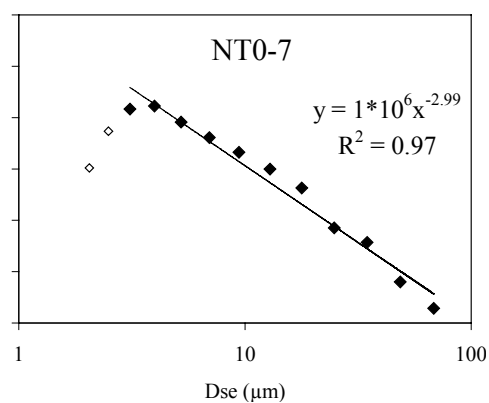
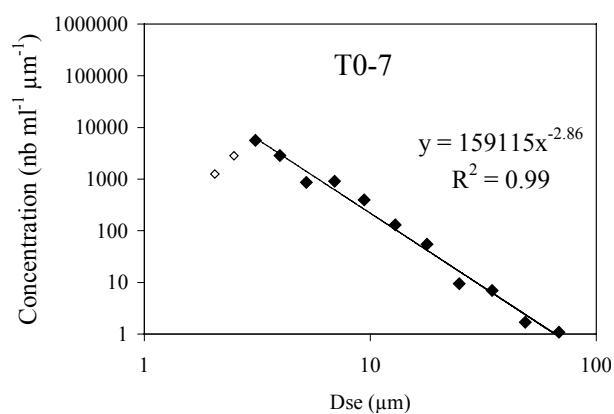
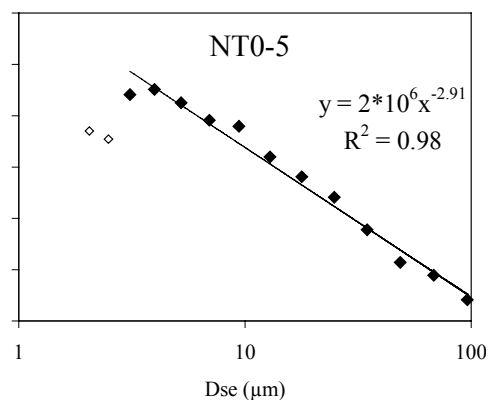
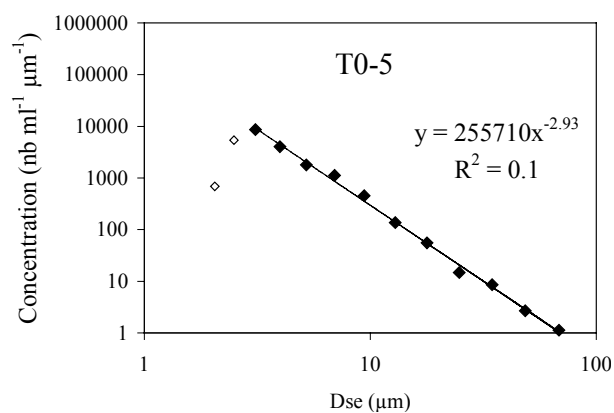


Annexe C1 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T0 et NT0, depuis les conditions initiales (jour 0) jusqu'au troisième jour de l'expérimentation.

Mésocosmes sans turbulence

Sans sels nutritifs (T0)

Avec sels nutritifs (NT0)

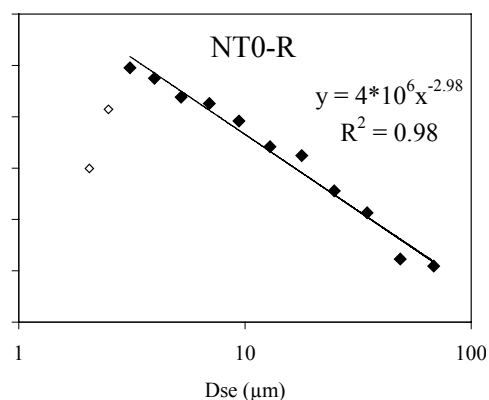
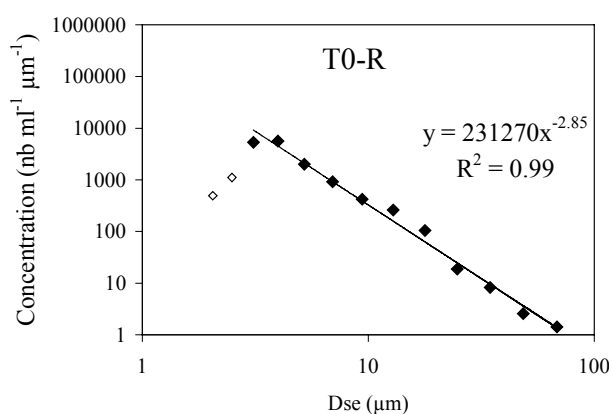
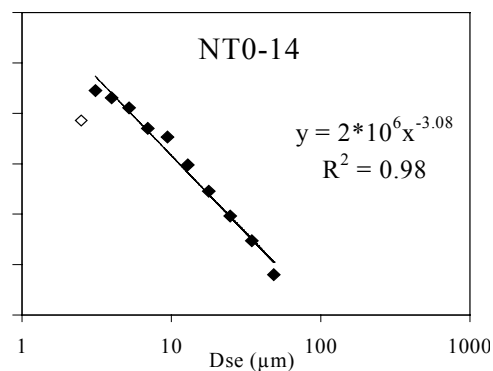
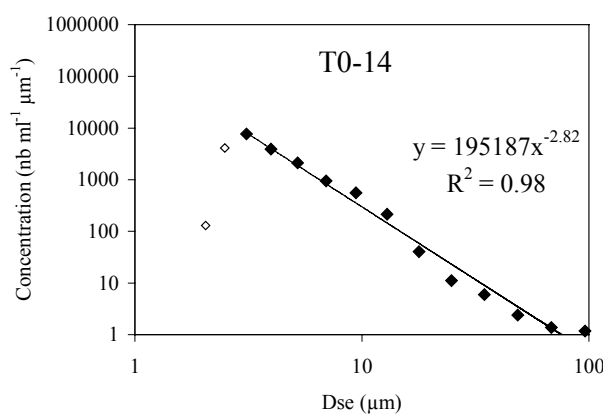
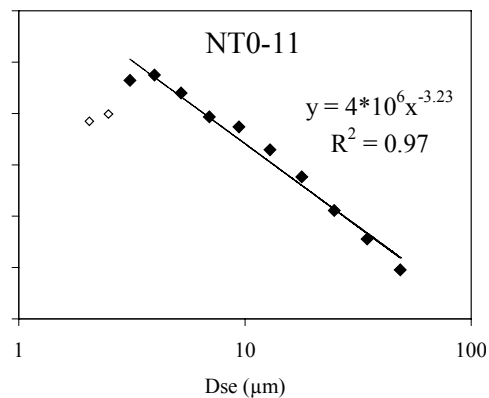
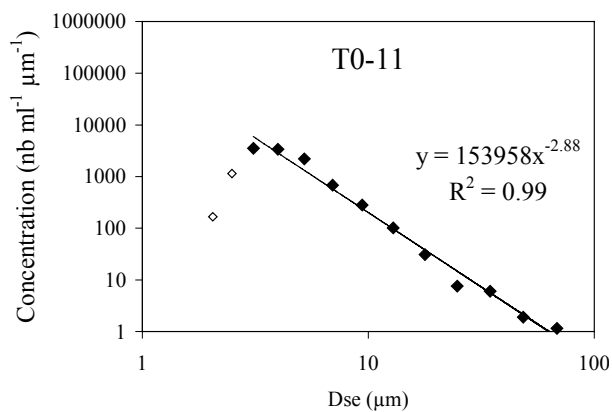


Annexe C2 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T0 et NT0, du jour 5 au jour 9 de l'expérience.

Mésocosmes sans turbulence

Sans sels nutritifs (T0)

Avec sels nutritifs (NT0)

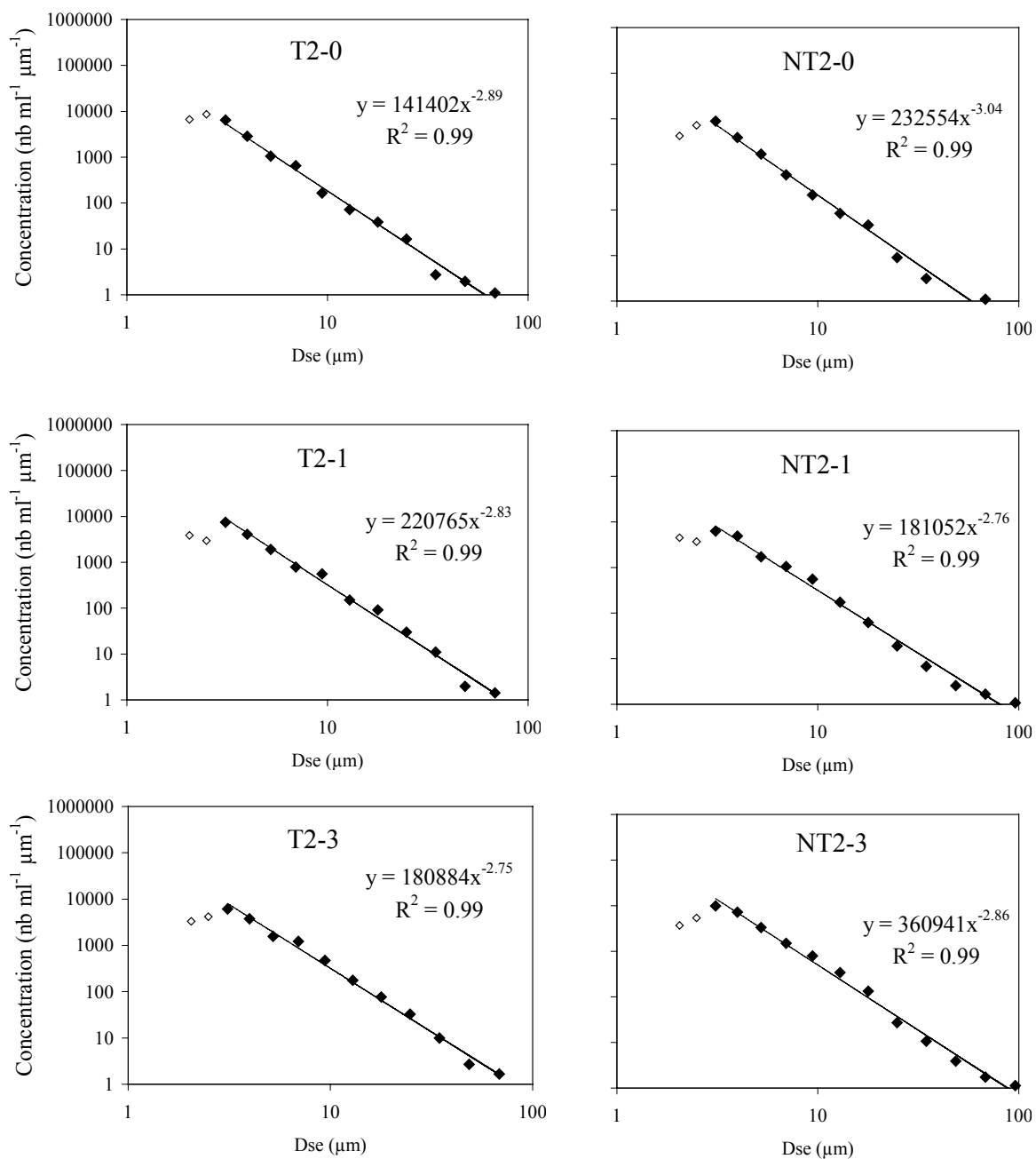


Annexe C3 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T0 et NT0, du jour 11 au jour 14 de l'expérimentation, et après remise en suspension (R).

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 2

Sans sels nutritifs (T2)

Avec sels nutritifs (NT2)

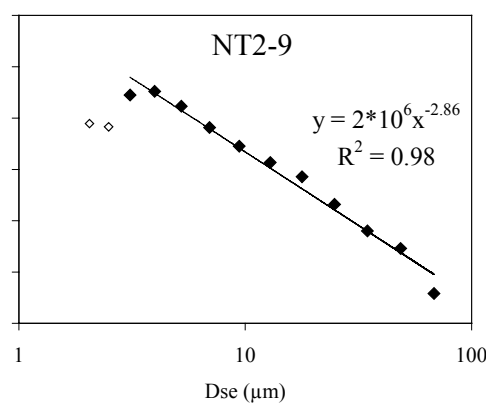
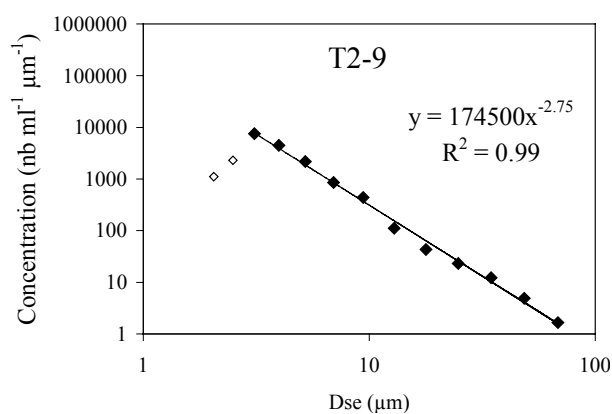
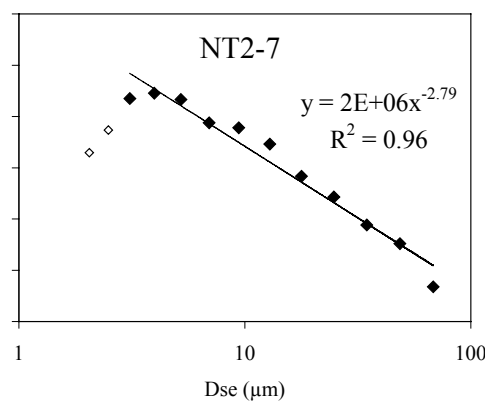
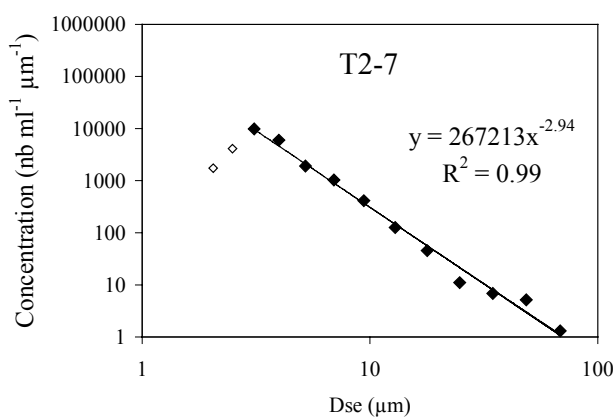
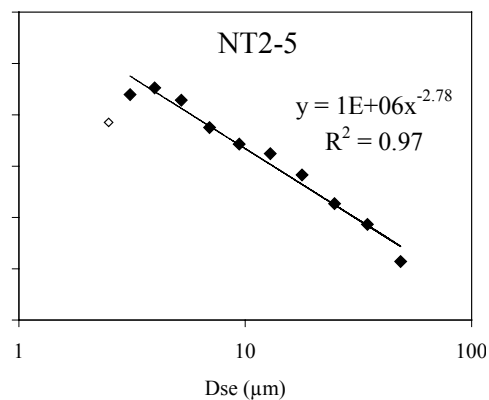
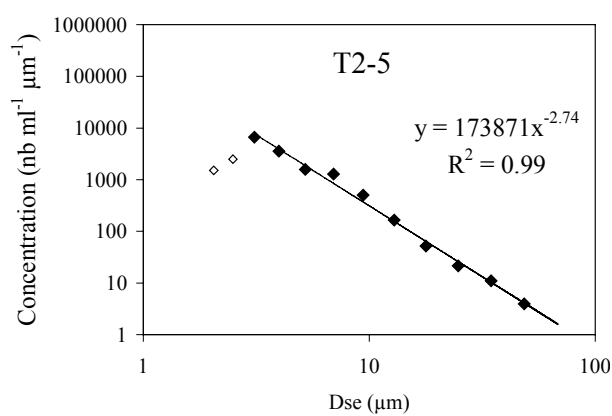


Annexe C4 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T2 et NT2, depuis les conditions initiales jusqu'au jour 3 de l'expérimentation.

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 2

Sans sels nutritifs (T2)

Avec sels nutritifs (NT2)

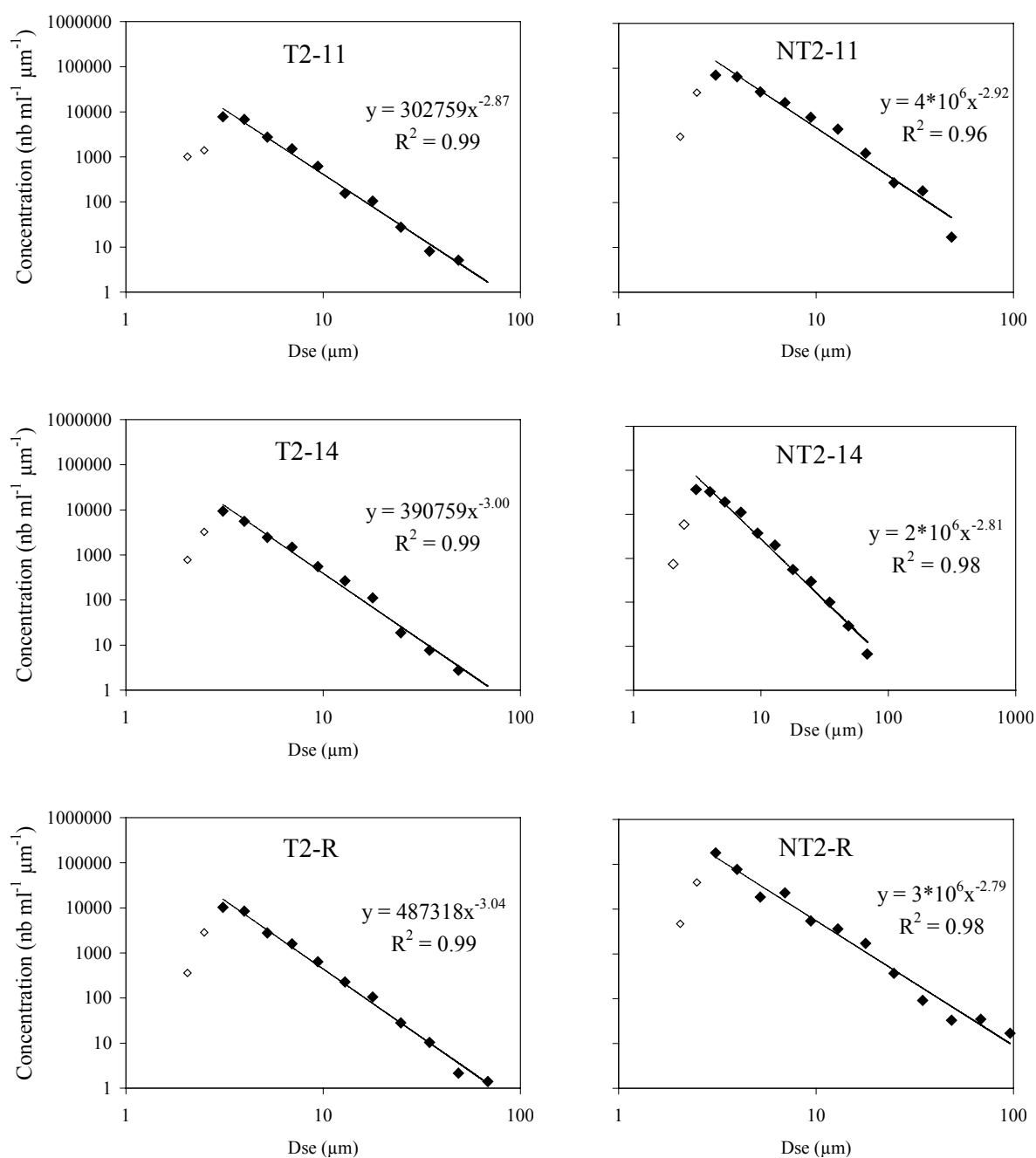


Annexe C5 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T2 et NT2, du jour 5 au jour 9 de l'expérience.

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 2

Sans sels nutritifs (T2)

Avec sels nutritifs (NT2)

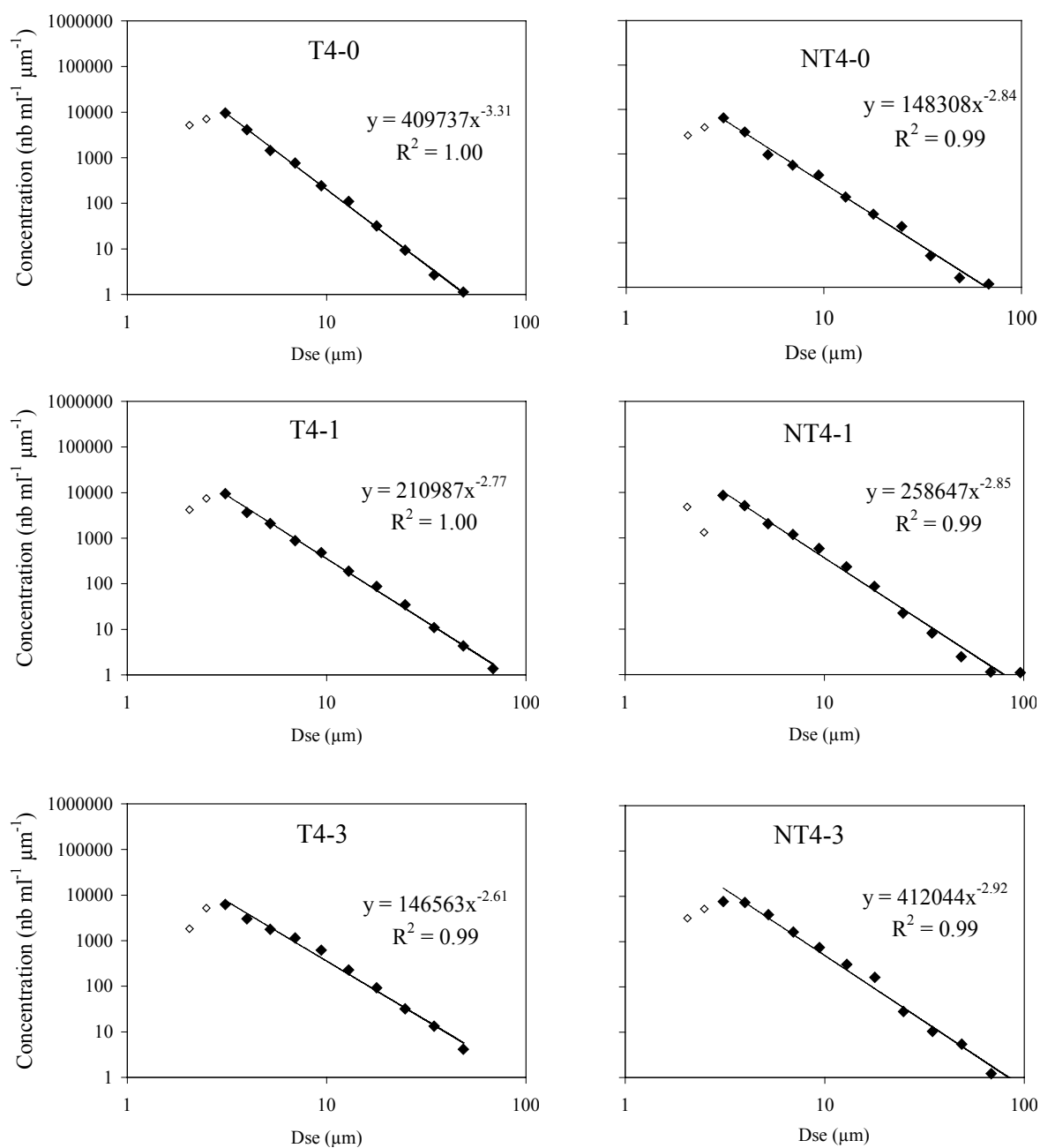


Annexe C6 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T2 et NT2, du jour 11 au jour 14 de l'expérimentation, et après remise en suspension (R).

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 4

Sans sels nutritifs (T4)

Avec sels nutritifs (NT4)

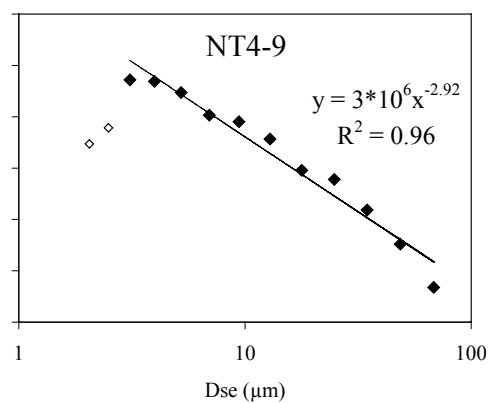
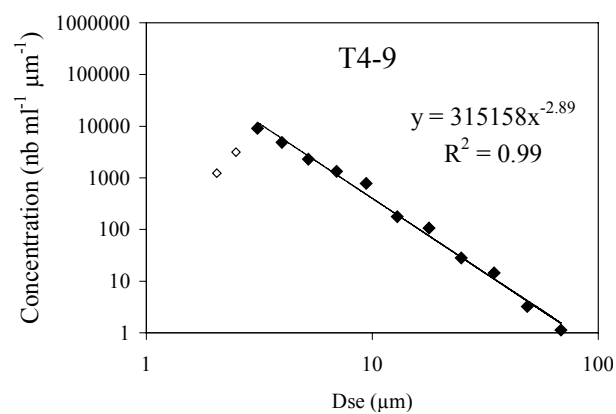
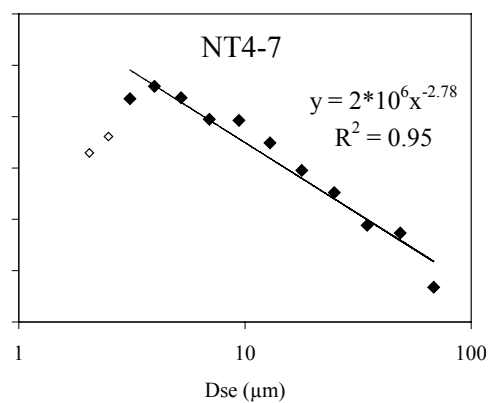
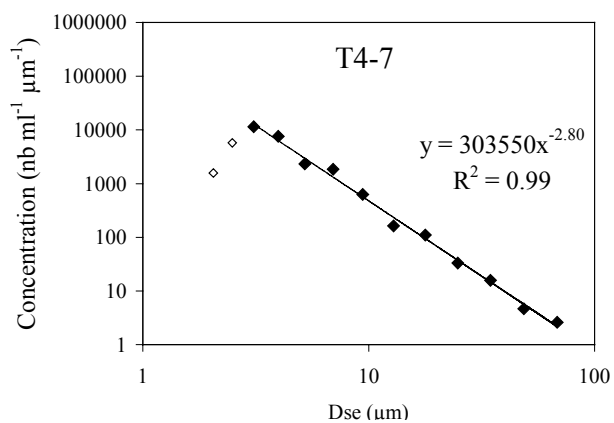
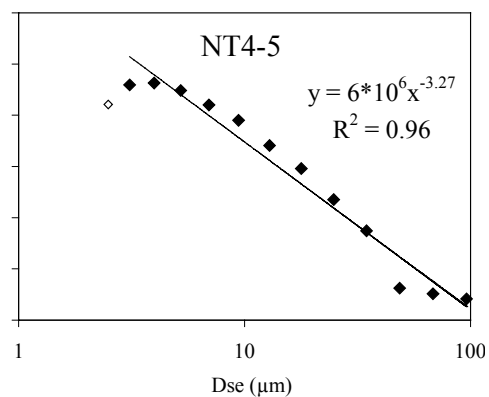
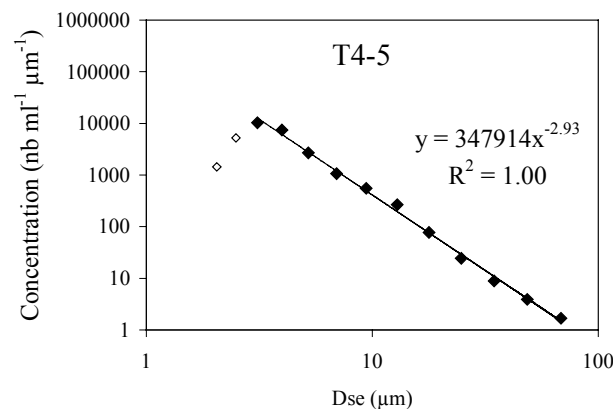


Annexe C7 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T4 et NT4, depuis les conditions initiales jusqu'au jour 3 de l'expérimentation.

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 4

Sans sels nutritifs (T4)

Avec sels nutritifs (NT4)

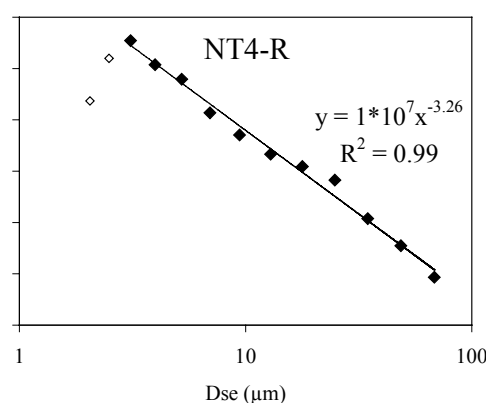
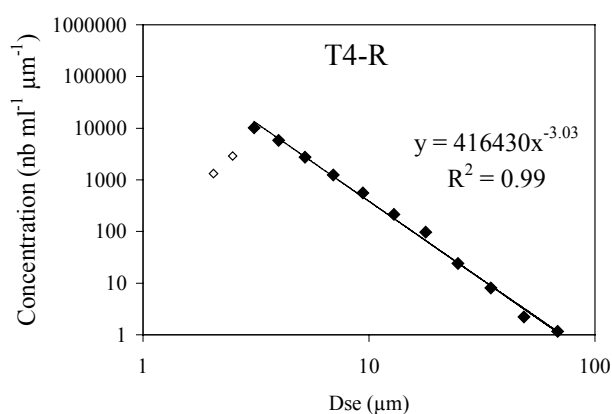
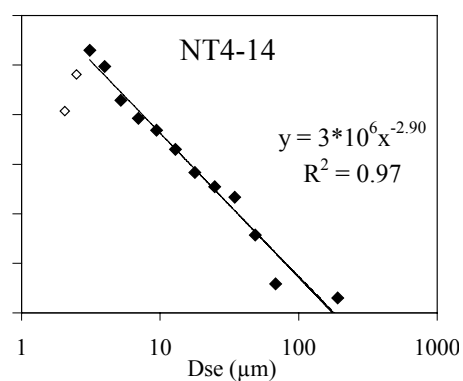
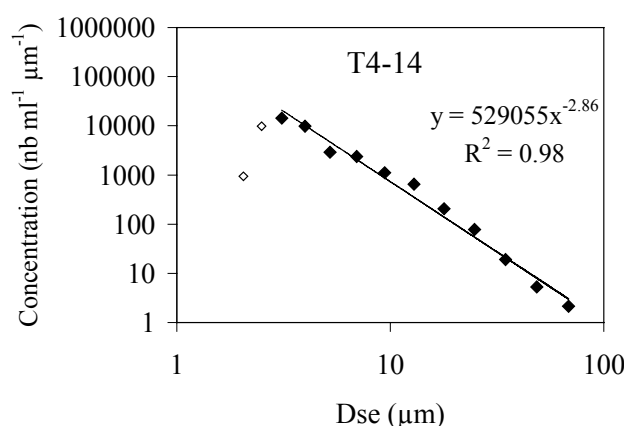
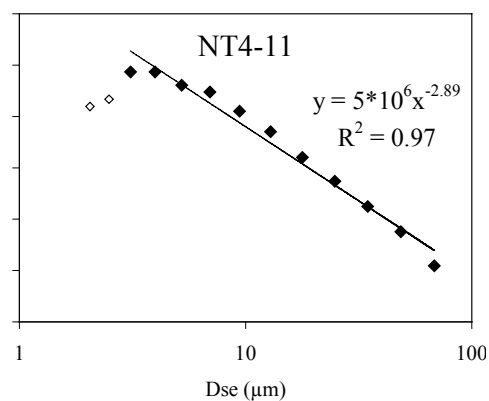
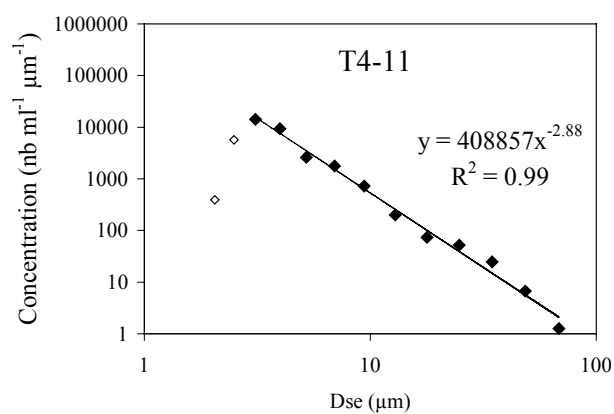


Annexe C8 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T4 et NT4, du jour 5 au jour 9 de l'expérience.

Mésocosmes soumis à une turbulence de niveau 4

Sans sels nutritifs (T4)

Avec sels nutritifs (NT4)



Annexe C9 : Spectres de taille des TEP dans les mésocosmes T4 et NT4, du jour 11 au jour 14 de l'expérience, et après remise en suspension (R).

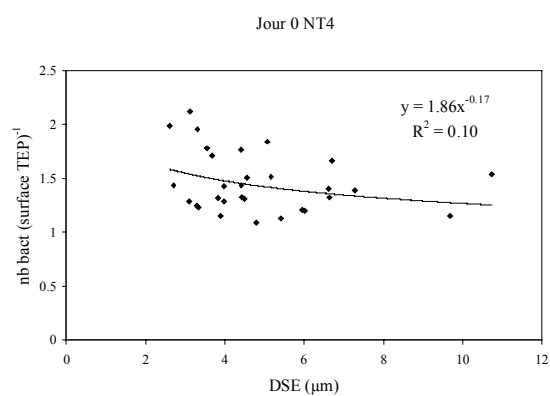
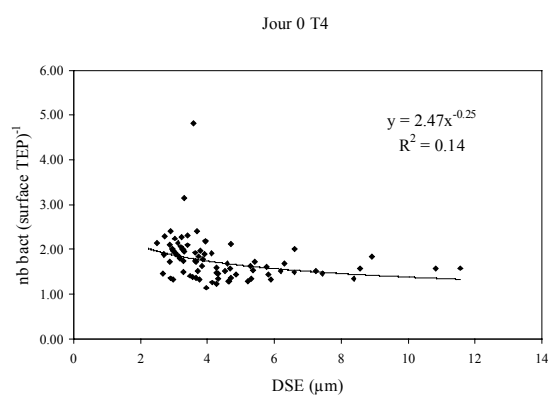
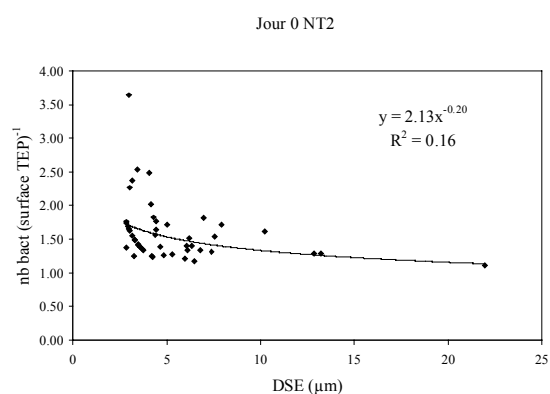
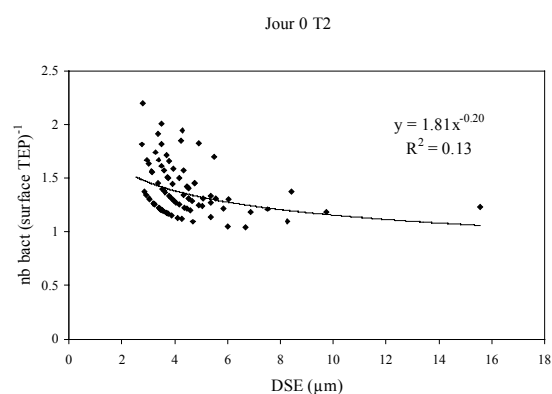
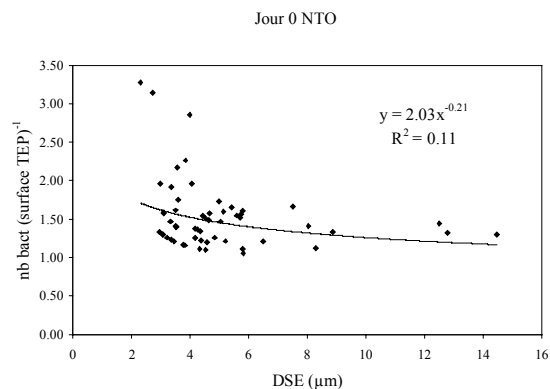
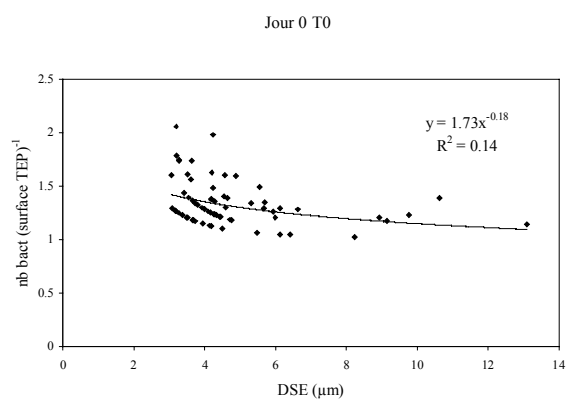
Annexe D

♣ Colonisation bactérienne des TEP (Chapitre IV).

Jour 0

Sans sels nutritifs (T)

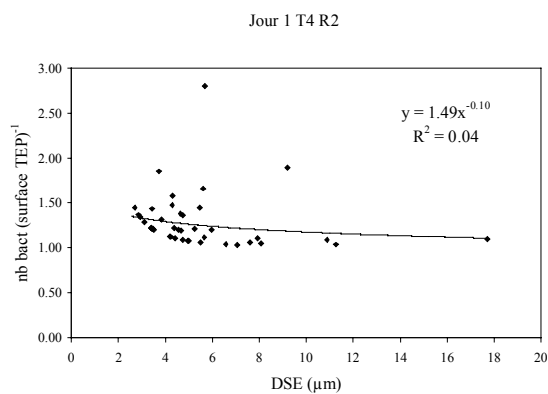
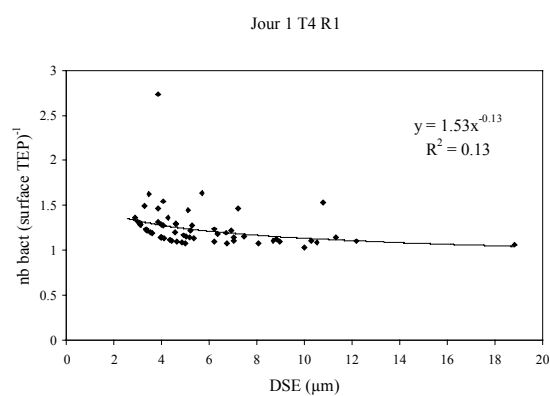
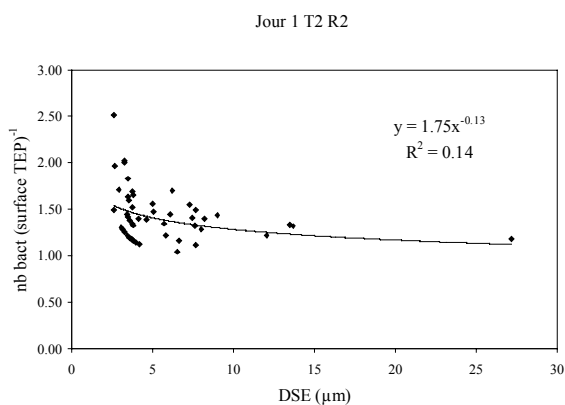
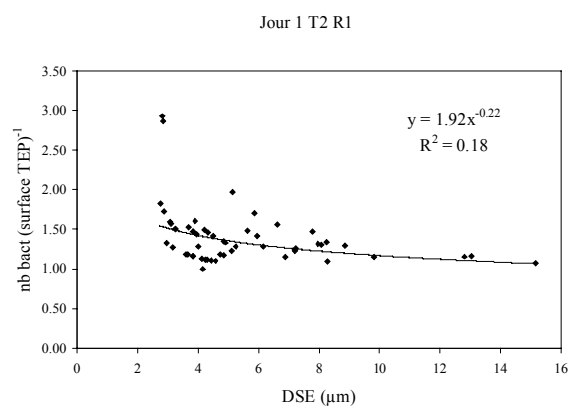
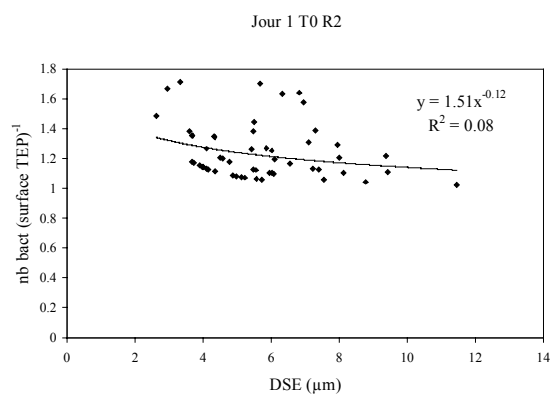
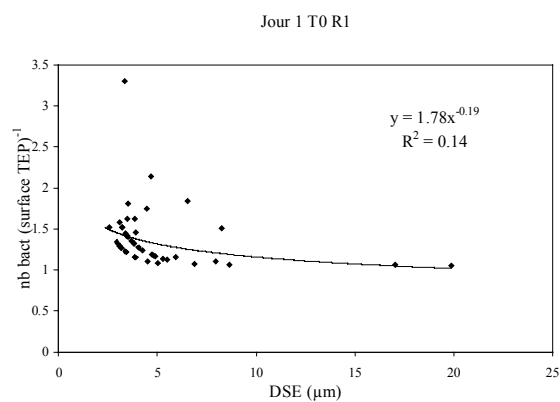
Avec sels nutritifs (NT)



Annexe D1 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) lors des conditions initiales (jour 0).

Jour 1

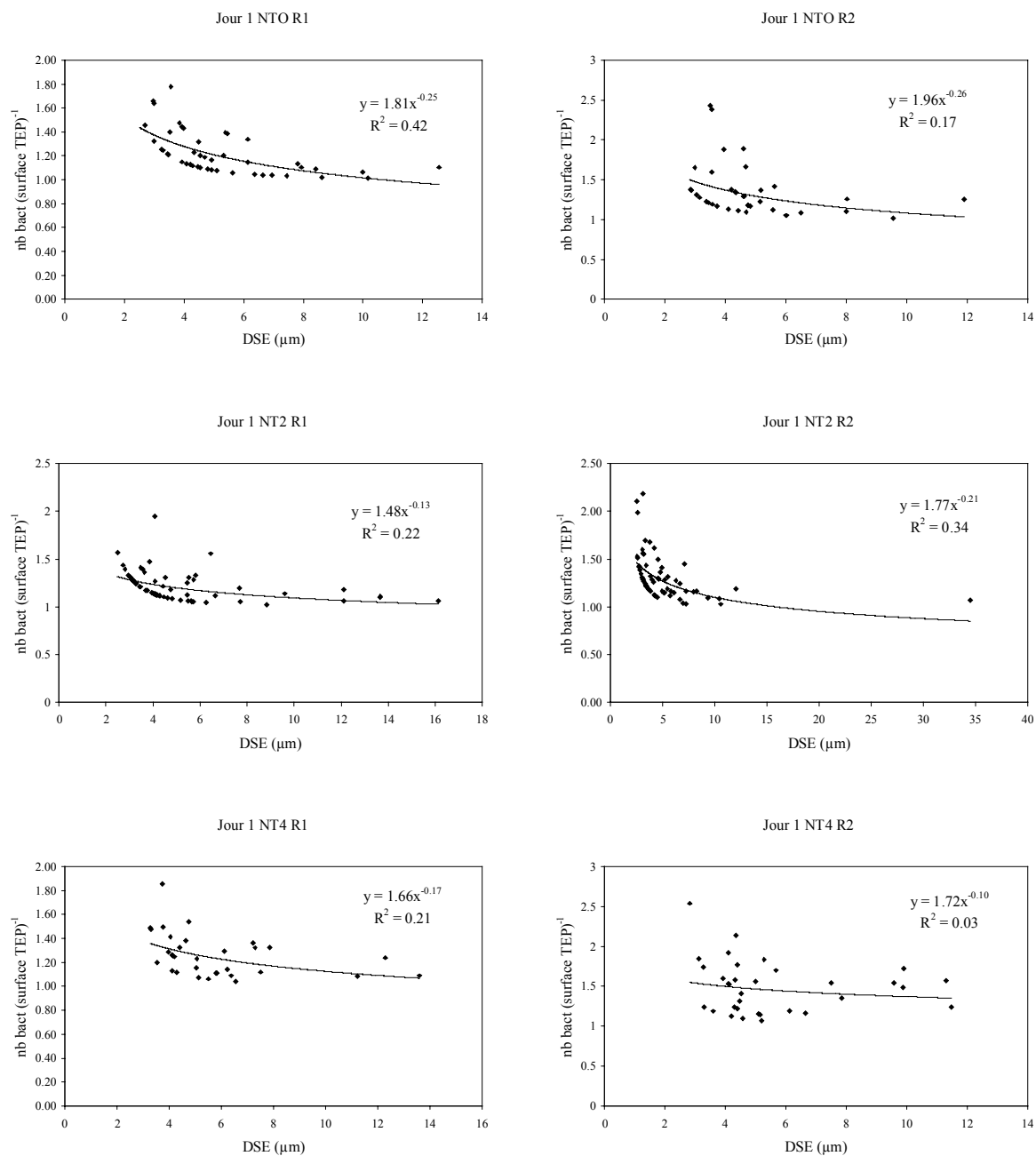
Sans sels nutritifs (T)



Annexe D2 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 24h d'expérimentation, dans les mésocosmes sans ajout de sels nutritifs (T).

Jour 1

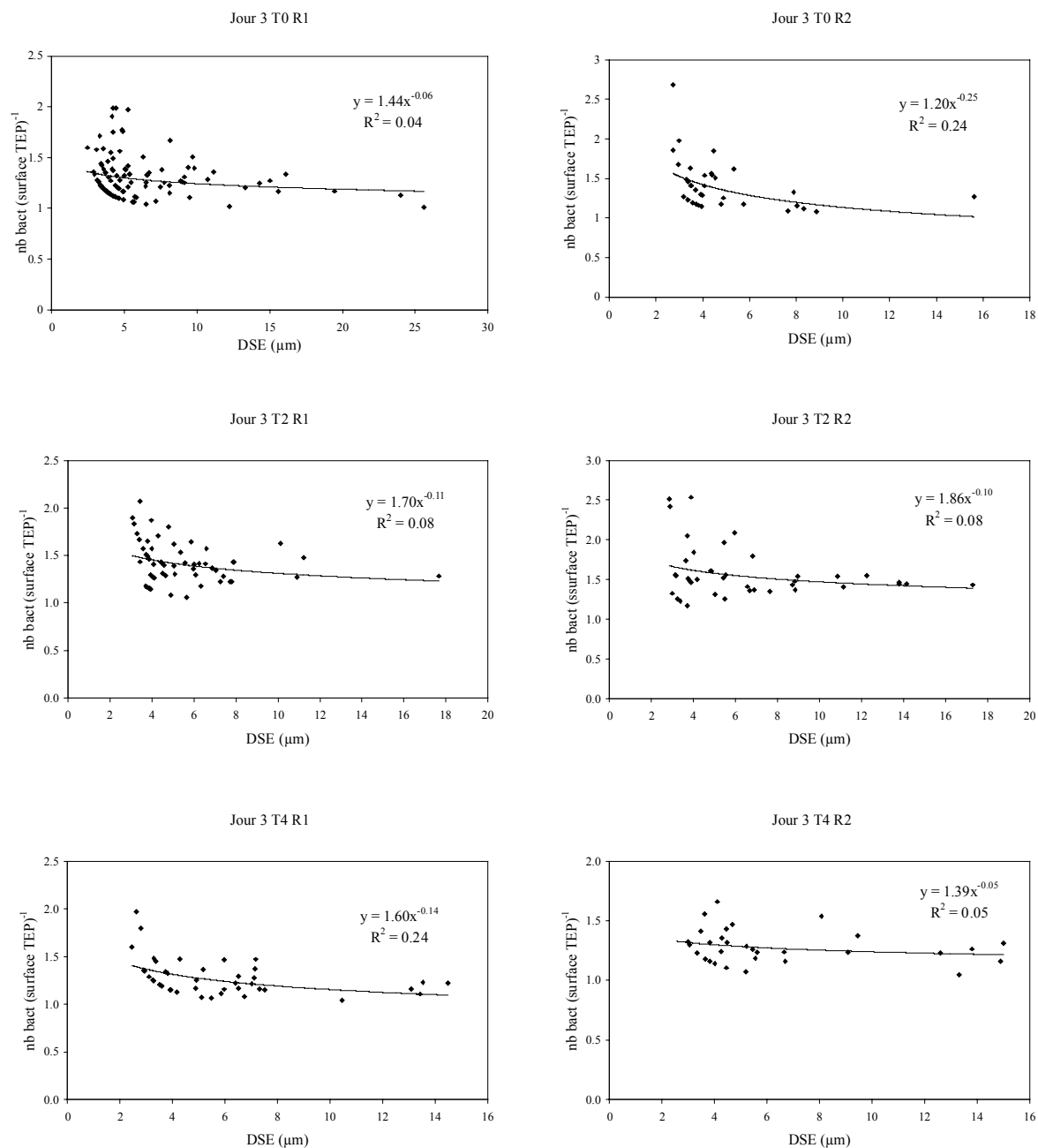
Avec sels nutritifs (NT)



Annexe D3 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 24h d'expérimentation, dans les mésocosmes enrichis de sels nutritifs (NT).

Jour 3

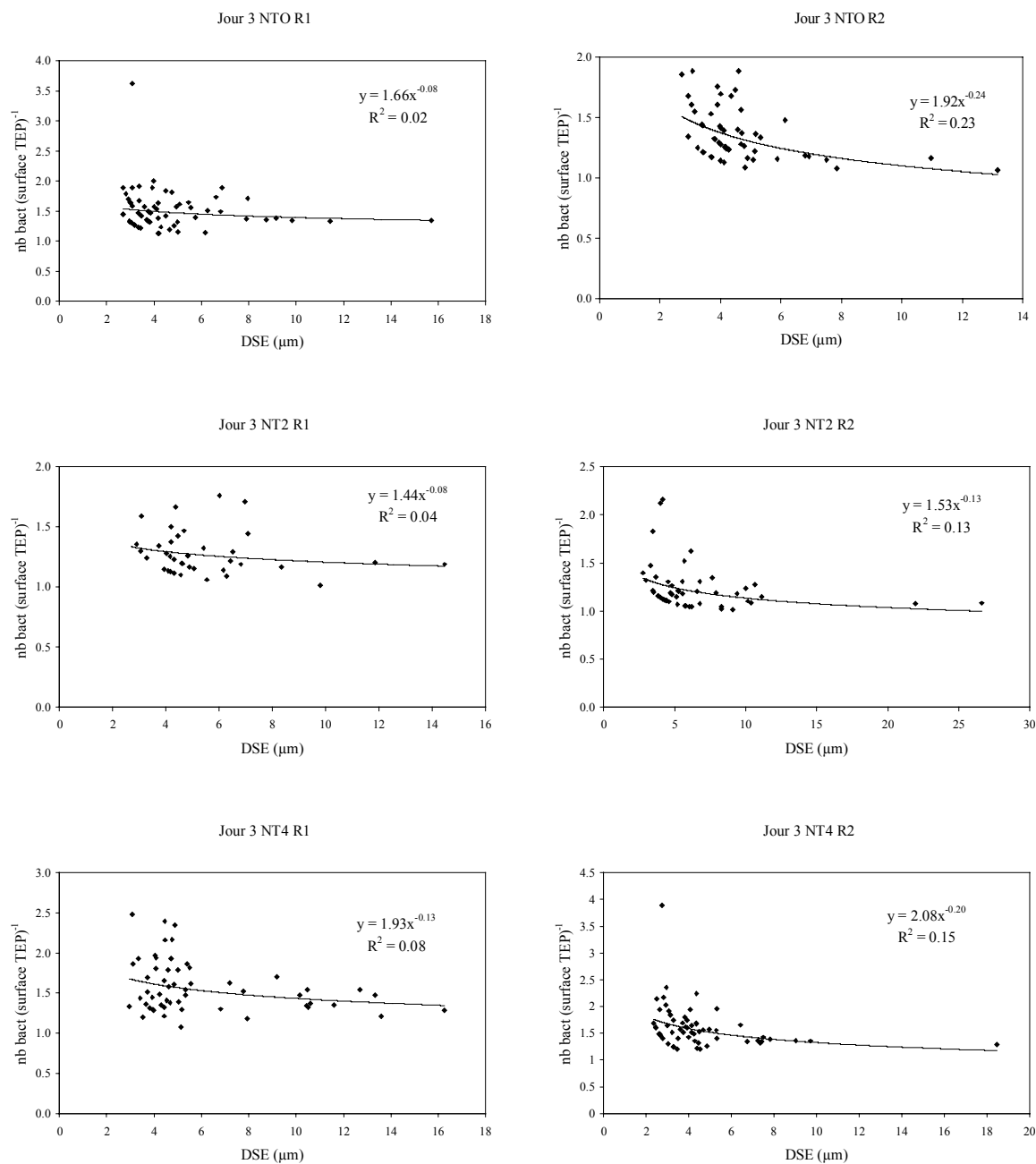
Sans sels nutritifs (T)



Annexe D4 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 3 jours d'expérimentation, dans les mésocosmes sans ajout de sels nutritifs (T).

Jour 3

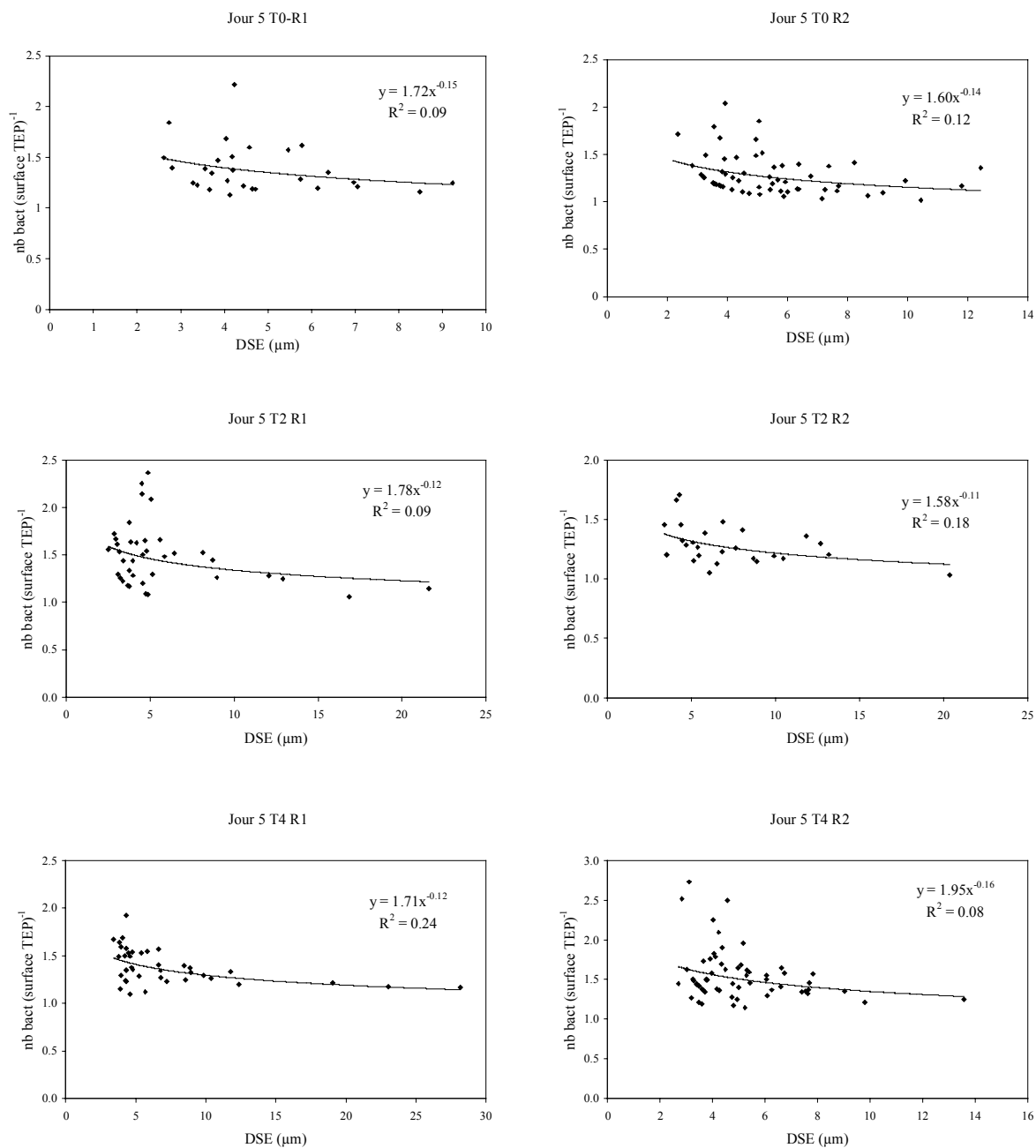
Avec sels nutritifs (NT)



Annexe D5 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 3 jours d'expérimentation, dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (NT).

Jour 5

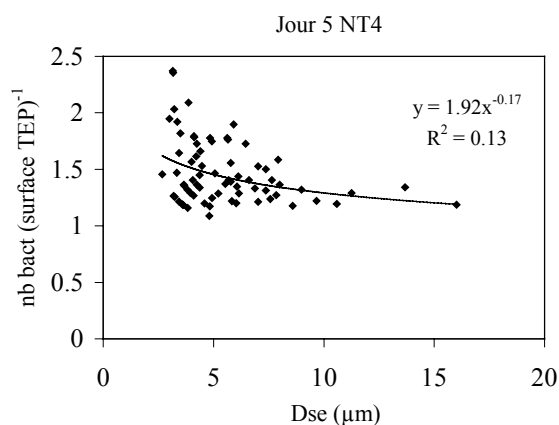
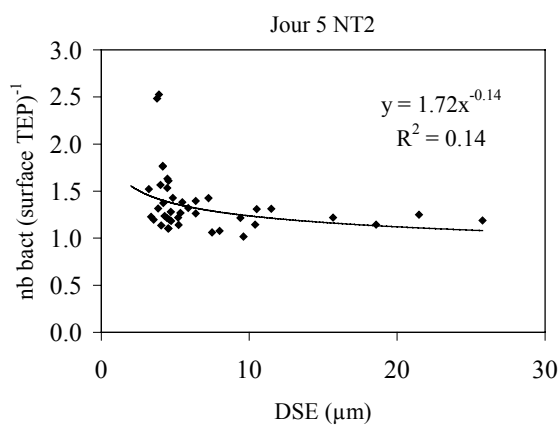
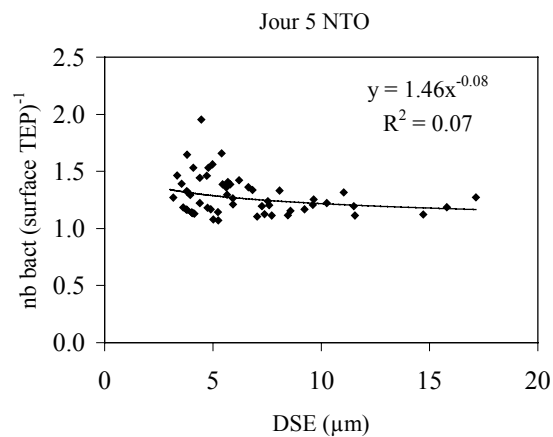
Sans sels nutritifs (T)



Annexe D6 : Nombre de bactéries par surface de TEP ($\text{nb } \mu\text{m}^{-2}$) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 5 jours d'expérimentation, dans les mésocosmes sans ajout de sels nutritifs (T).

Jour 5

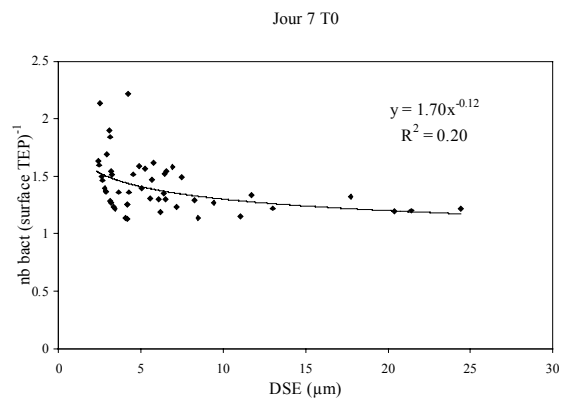
Avec sels nutritifs (NT0)



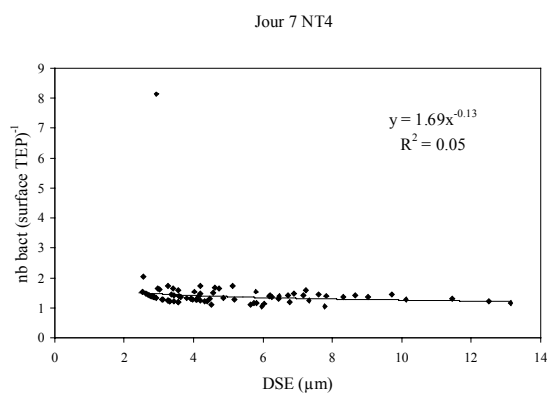
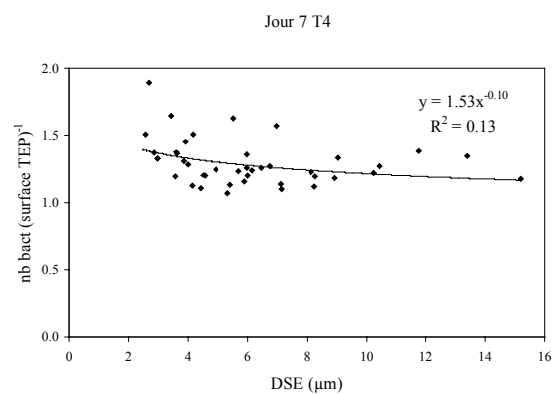
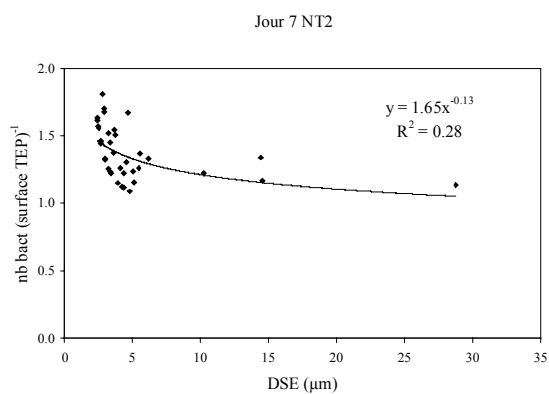
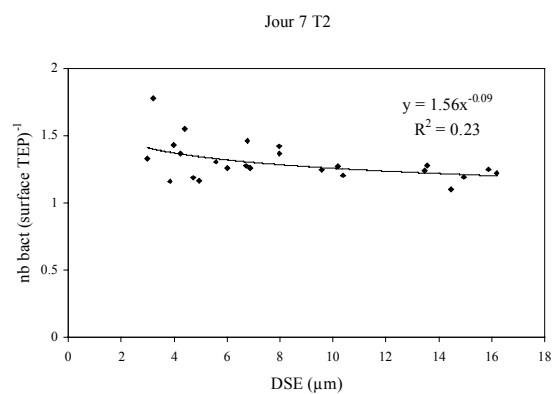
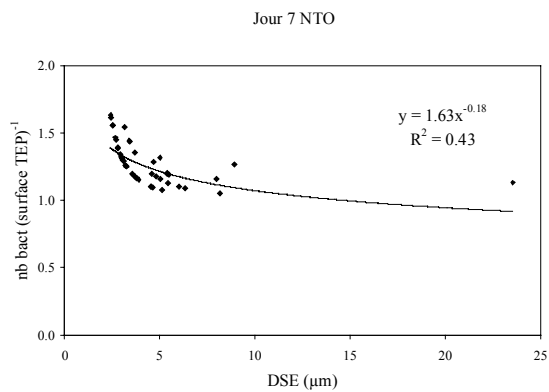
Annexe D7 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 5 jours d'expérimentation, dans les mésocosmes enrichis en sels nutritifs (T).

Jour 7

Sans sels nutritifs (T0)



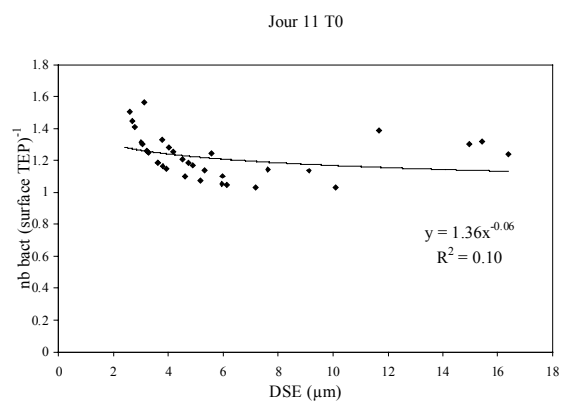
Avec sels nutritifs (NT0)



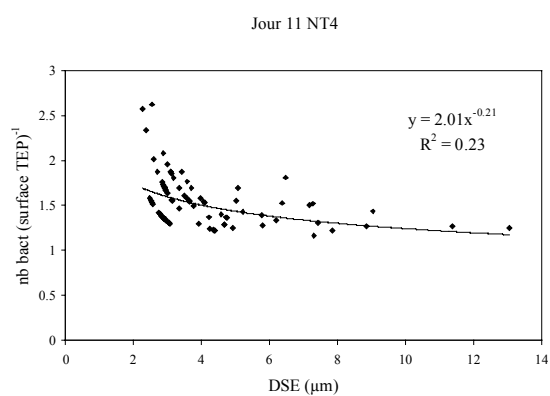
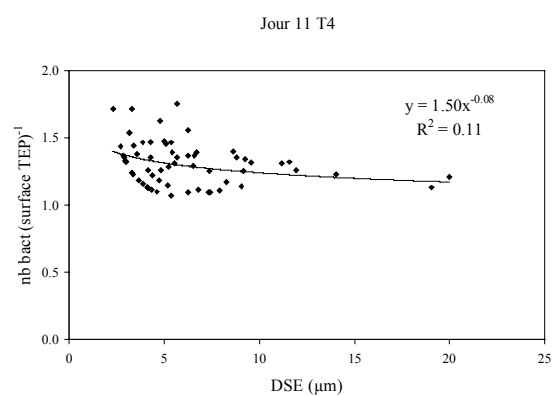
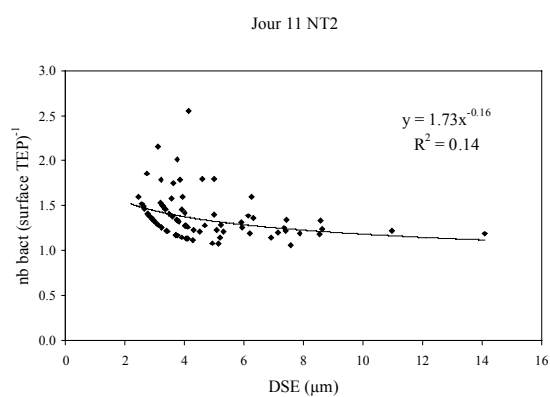
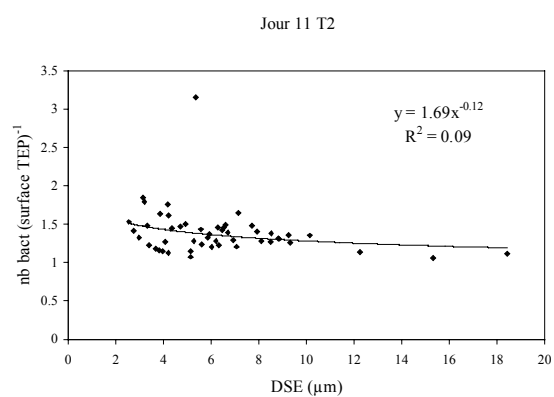
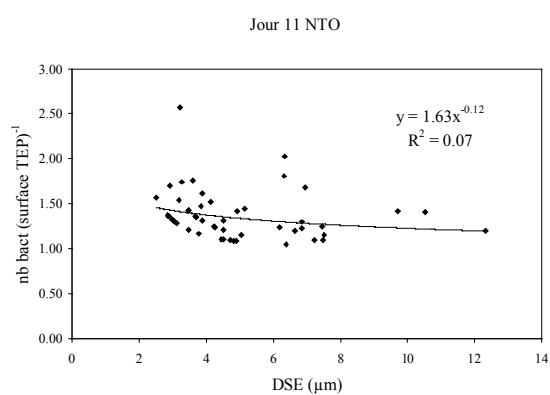
Annexe D8 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm⁻²) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 7 jours d'expérimentation.

Jour 11

Sans sels nutritifs (T0)



Avec sels nutritifs (NT0)



Annexe D9 : Nombre de bactéries par surface de TEP (nb μm^{-2}) en fonction de la taille des TEP (Dse, μm) après 11 jours d'expérimentation.

Annexe E

♣ Publications de rang A, issues de ce travail de recherche

1) Mari X., Beauvais S., Lemée, R., & Pedrotti M-L. (2001). Non Redfield C:N ratio of transparent exopolymeric particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 46(7), p1831-1836.

2) Beauvais S., Pedrotti M-L., Villa E., Lemée R. (2003). TEP dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* (in press).

Non-Redfield C:N ratio of transparent exopolymeric particles in the northwestern Mediterranean Sea

Abstract—The stoichiometric model of Redfield, which describes the elemental composition of marine organic matter, is generally used to link the production of new organic matter to the uptake of nitrate. The Redfield C:N molar ratio of 6.6 is a well-established value for particulate organic matter produced in surface waters. Yet recent studies have shown that the inorganic C:N uptake ratio during nitrate-limiting conditions is >14 . This non-Redfield behavior during the production of new organic matter suggests that a large standing stock of organic matter, rich in carbon, should accumulate in the euphotic zone from the spring bloom to late summer. This hypothetical pool of carbon-rich organic matter and the pool of transparent exopolymeric particles (TEP) exhibit similar seasonal distributions, which suggests that TEP may indeed be this carbon-rich pool. For this scheme to work, TEP should have a high C:N ratio.

TEP distribution from an open-ocean site in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED) was monitored, and TEP C:N ratio was measured from TEP produced in the laboratory by bubbling dissolved organic matter collected in the field. We found that the TEP pool increases during the summer season and that the C:N ratio of TEP produced from naturally occurring dissolved organic matter, is well in excess of the Redfield ratio with an overall average C:N molar ratio of ~ 20 . As a result, the production of TEP could be the main pathway of carbon overconsumption required of oligotrophic, nitrate-limiting waters, and, thus, TEP may represent an important intermediary pool in the ocean carbon cycle.

Photosynthesis within the euphotic layer of the ocean is the process by which biogenic carbon is produced from dissolved inorganic carbon, thus favoring the penetration of atmospheric carbon towards the oceans. The export of primary production from the surface water is a key component of the ocean carbon cycle. This deep carbon export, often referred to as the biological pump, is responsible for maintaining a vertical gradient of dissolved inorganic carbon (DIC) and thus is a drawdown of atmospheric carbon over the long term (Sarmiento and Siegenthaler 1992). In order to predict carbon export, the amount of DIC fixed by photosynthesis into organic carbon must be known. However, when measurements have been made of the concurrent drawdown of DIC and nitrate (Sambrotto et al. 1993; Banse 1994; Marchal et al. 1996; Copin-Montégut 2000), the amount of carbon removed from the water significantly exceeded the amount predicted based on the nitrate removal and the Redfield C:N ratio (Redfield et al. 1963). This process, defined by Toggweiler (1993) as carbon overconsumption, could be explained by the formation of a large pool of organic matter, unnoticed so far, cycling through the system with an anomalous C:N ratio. The production of such a pool may result if the overproduction of phytoplankton (i.e. carbon-rich exopolymer production) is added into the system.

The recently discovered pool of transparent exopolymeric particles (TEP) can help us to understand the observed carbon overconsumption and may force us to revise the origi-

nally accepted views of the biological pump. TEP range in size from one to hundreds of microns in diameter and are found in high concentrations in a variety of marine environments (Alldredge et al. 1993; Schuster and Herndl 1995; Mari and Burd 1998). They are formed by coagulation of dissolved organic matter (DOM) (Mari and Burd 1998; Zhou et al. 1998; Mari 1999; Passow 2000), which is known to be produced in large amounts by phytoplankton during nutrient-limiting conditions (Obernosterer and Herndl 1995). DOM produced during blooms, and especially its high molecular weight fraction, exhibits a high C:N molar ratio (from 13 to 21) due to the leakage of carbon-rich exopolymers, such as polysaccharides, from phytoplankton cells (Biddanda and Benner 1997; Kepkay et al. 1997). This production of carbon-rich DOM may lead to the formation of a large pool of DOM that is not stoichiometrically locked into the Redfield C:N ratio and accumulates in the euphotic zone from spring to late summer (Copin-Montégut and Avril 1993; Carlson et al. 1994; Williams 1995). This accumulation could be the consequence of a high net inorganic C:N assimilation ratio (i.e. >14), which in turn would require carbon overconsumption.

Given that the seasonal distributions of TEP in a eutrophic area (Mari and Burd 1998) and C-rich DOM (Williams 1995) are similar, it has been suggested that C-rich DOM is the source of TEP (Mari and Burd 1998). As a result, one can hypothesize that, from the spring bloom and throughout the summer season, phytoplankton produces large amounts of C-rich DOM, which coagulates and gives rise to the pool of TEP that decomposes when nutrients increase to prebloom concentrations. This scenario implies that primary production is not limited to the production of biomass but also includes extracellular products such as C-rich DOM and TEP. Therefore, the biological consumption of atmospheric carbon may have been underestimated because the production of C-rich DOM and TEP has, effectively, been excluded from measurements of primary production. The objectives of this study were to examine the seasonal distribution of TEP, to determine whether their accumulation in summer is a common phenomenon in both eutrophic and oligotrophic waters, and to measure the TEP C:N molar ratio to test the hypothesis that TEP production is the byproduct of carbon overconsumption.

Water column characteristics—The field study was carried out in the vicinity of the France-JGOFS station in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site, $43^{\circ}25'N$, $07^{\circ}52'E$), where both the accumulation of C-rich DOM (Copin-Montégut and Avril 1993) and carbon overconsumption (Copin-Montégut 2000) have been observed. Seawater samples were collected at DYFAMED from the layer of fluorescence maximum with 30-liter Niskin bottles at monthly

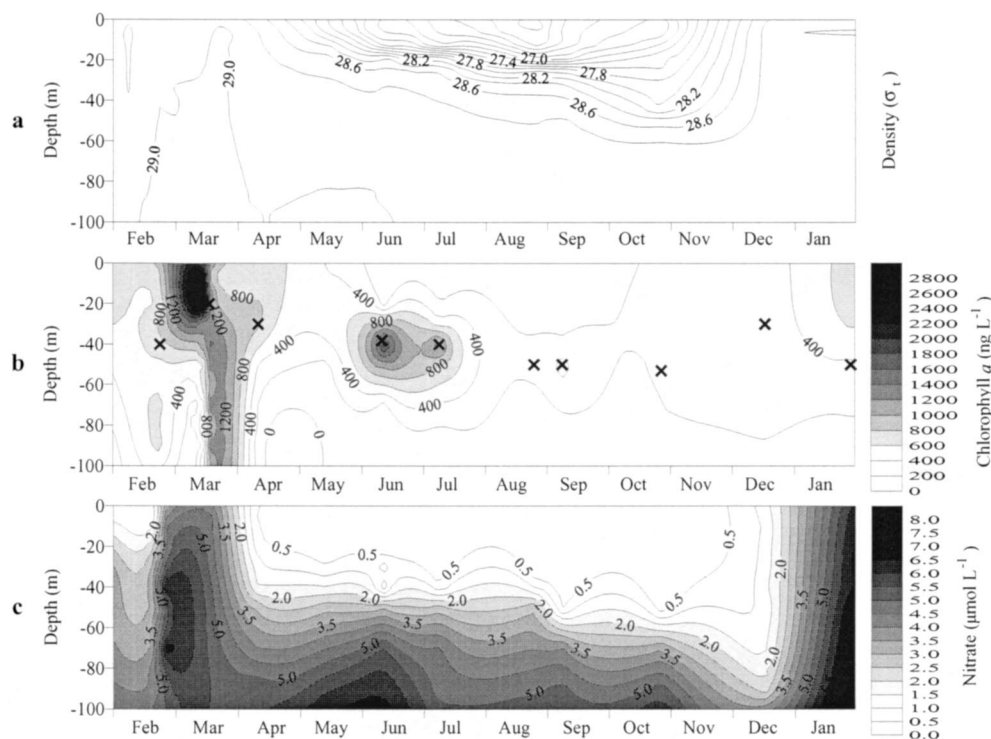


Fig. 1. Seasonal variations in the water column of (A) density, (B) Chl *a* concentration with position of the sampling depths for TEP determination (crosses), and (C) nitrate concentration.

intervals (from February 1999 to January 2000). Sampling depths were determined from the CTD casts. The concentrations of nitrate (NO_3^-) were measured by an autoanalyzer. Chlorophyll *a* concentrations were measured by high-performance liquid chromatography pigment analysis.

The water column was strongly stratified from May to November, with a pycnocline around 20 m (Fig. 1a). The seasonal distribution of Chl *a* (Fig. 1b) was characterized by a spring bloom in the beginning of March (up to $3 \mu\text{g chl L}^{-1}$ in the surface mixed layer). An increase in Chl *a* concentration (up to $1.2 \mu\text{g chl L}^{-1}$) was also observed during June at the pycnocline layer. The nitrate concentrations (Fig. 1c) decreased from the beginning of the spring bloom and

remained low until late autumn, with maximum concentrations in the surface mixed layer of $0.5 \mu\text{M}$.

TEP seasonal distribution—In situ TEP size spectra were determined from semipermanent slides of TEP prepared according to the method described by Passow and Alldredge (1994). All samples were prepared fresh and within 2 h after sampling. For each slide, TEP were counted and sized at three successive magnifications (respectively, 125, 250, and $500\times$) by use of a compound light microscope. The equivalent spherical diameter (ESD) of each TEP was calculated by measuring of its cross-sectional area with a semiautomatic image-analysis system. Counts were combined and classified according to their ESD.

TEP occurred at all sampling occasions and concentrations varied between 0.1×10^5 and $2.2 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$ (Fig. 2). TEP concentrations were low ($<0.3 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$) until the beginning of April and then increased abruptly subsequent to the spring bloom, with the highest concentrations observed at the beginning of June. TEP concentration then declined until the end of January to reach values similar to those observed before the spring bloom. TEP volume concentration varied between 0.2 ppm and 8.3 ppm (Fig. 2) and increased by a factor of six from nonlimiting to limiting nitrate conditions (late March to June). The TEP pool began to increase right after the spring bloom, and TEP volume concentrations remained high throughout summer (from June to September).

The seasonal distribution of TEP at the DYFAMED station was similar to that observed by Mari and Burd (1998)

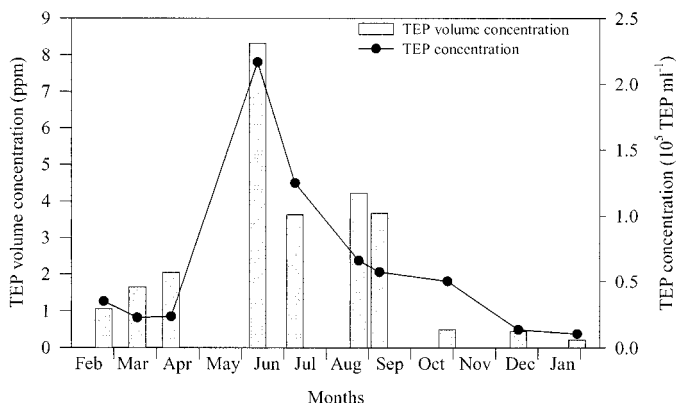


Fig. 2. Seasonal variations of TEP abundance and TEP volume concentration at the fluorescence maximum.

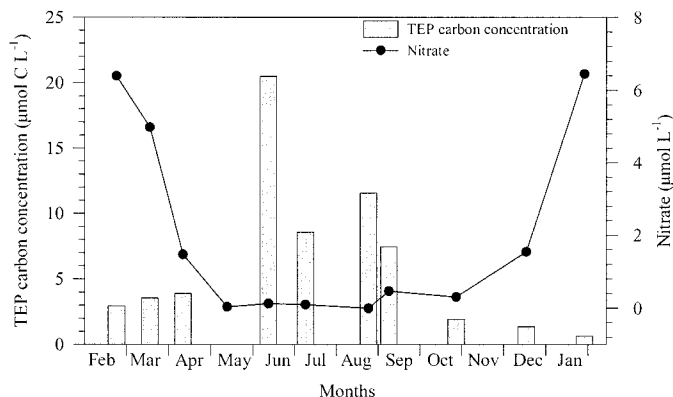


Fig. 3. Seasonal variations at the fluorescence maximum of TEP carbon concentration, compared with the annual pattern of NO_3 concentration. TEP carbon concentrations were calculated from the carbon-size relationship (Mari 1999) and field TEP size spectra.

at a coastal station in the southern Kattegat—i.e., TEP accumulated during summer. The difference in the range of TEP volume fraction between DYFAMED (from 0.2 ppm to 8.3 ppm) and the Kattegat (from 3 ppm to 100 ppm, at the pycnocline layer) reflects a difference of trophic regimes between the two sites and is consistent with the observation that the abundance of TEP tends to increase along productivity gradients (Schuster and Herndl 1995).

TEP carbon concentration—TEP size distributions at the DYFAMED site were used along with the well-defined carbon-size relationship $\text{TEP-C} = 0.25 r^{2.55}$ (pg C TEP $^{-1}$), where TEP-C (pg C) is the carbon content of a given TEP particle with a radius r (μm) (Mari 1999), to estimate the TEP carbon pool. The use of the TEP carbon-size relationship (obtained from TEP produced in the laboratory by coagulation of diatom exudates, by use of a bubble adsorption column) to predict naturally occurring TEP-C concentration presupposes that field and laboratory produced TEP have similar carbon content. Comparison between expected TEP carbon concentration from the carbon-size relationship (Mari 1999) and measured TEP carbon concentration inside the bubbling column showed that the model explains ~75% of the observed particulate organic carbon (POC) concentration ($\text{POC}_{\text{measured}} = 0.87 \text{ POC}_{\text{expected}} + 0.01$; $r^2 = 0.75$; $n = 18$). This suggests that the carbon content of TEP produced from naturally occurring DOM is of the same range as that of TEP produced from exudates of diatoms.

Estimated carbon concentrations in the TEP pool ranged from 0.6 to 20.5 μmol C L $^{-1}$ (Fig. 3). TEP carbon concentrations were low (<4 μmol C L $^{-1}$) from February to April and increased up to 20.5 μmol C L $^{-1}$ from April to June. TEP-C concentrations remained high throughout summer (12.0 ± 5.9 μmol C L $^{-1}$; mean \pm SD) and declined at the beginning of the fall, to reach concentrations similar to those observed before the summer accumulation. The accumulation of the TEP pool during summer (in terms of abundance, volume, and carbon concentration) coincided with N-limiting conditions.

During a study in the northwestern Mediterranean Sea, Copin-Montégut and Copin-Montégut (1983) reported POC

concentrations in the surface layer ranging from 3.6 to 16.2 μmol C L $^{-1}$, the highest value being recorded in May. Under the assumption that these values are typical for this area, it suggests that the TEP pool at DYFAMED may represent up to 70% of the total POC when TEP formation is high, down to ~20% when TEP formation is low.

TEP C:N ratio—TEP produced by bubbling DOM (Zhou et al. 1998; Mari 1999) from GF/C-filtered seawater were used for TEP C:N ratio determination. Seawater samples collected at DYFAMED were filtered at a low and constant vacuum pressure (<150 mbar) through 125-mm diameter Whatman GF/C filters (nominal pore size 1.2 μm). The filtrate was added to a bubble adsorption column of borosilica glass (200 cm high and 10 cm diameter) and bubbled with Ultra Zero Grade Air ($\text{CO} + \text{CO}_2 < 1$ ppm). The gas flow rate was 100 ml min $^{-1}$. Bubbles were produced by a glass frit of 10 to 20 μm pore size. The glass frit was fitted online with a 0.1-μm air filter and a trap that contained molecular sieves for removal of organic impurities and moisture. Between each experiment, the glass frit was soaked in 35% HCl and was rinsed three times with Milli-Q water. Samples for C:N ratio measurements were collected in the middle of the column after 1, 3, and 5 h of bubbling and were immediately filtered for TEP determination and for measurements of particulate carbon and nitrogen concentrations by use of a Leco-900 CHN-analyzer. A series of five aliquots of increasing volume, typically 100–500 ml, were filtered onto 25 mm Whatman GF/F filters (nominal pore size 0.7 μm) precombusted at 550°C for 2 h. After filtration the filters were dried at 60°C for 24 h and then frozen for later analysis.

On the basis of the following arguments, we believe that particulate carbon measured is nonliving POC. Considering that the DIC concentration at DYFAMED is about 2.2 mol m $^{-3}$ (Copin-Montégut 2000), that the water content of a wet GF/F filter is 210 μl, and that the particulate carbon concentration measured was, on average, ~50 μg C filter $^{-1}$ (range 3–204 μg C filter $^{-1}$), DIC would add an average of ~0.07% (range 0.02%–1.15%) to the measured carbon concentration. Additionally, because the GF/C-filtered seawater was bubbled with a carbon-free gas, one would expect the DIC concentration to decline during the bubbling. Thus, a DIC concentration of 2.2 mol m $^{-3}$ inside the bubbling column can be considered as a maximum. Finally, because the seawater used to form TEP was filtered onto a GF/C filter prior to bubbling, one can expect that most of the particulate inorganic carbon was removed and, thus, that the only significant source of inorganic carbon in the bubbling column was DIC. Therefore, we consider that the concentration of particulate carbon measured is very close to POC.

POC and particulate organic nitrogen (PON) due to bacterial biomass on the GF/F filters were calculated from bacterial abundance, under the assumption of a carbon content of 12.4 fg/cell for oceanic heterotrophic bacteria and a C:N ratio of 6.4 (Fukuda et al. 1998). Total bacterial abundance was determined for each bubbling experiment in 5-ml samples filtered onto 0.2-μm black polycarbonate filters after staining with 0.1 μg ml $^{-1}$ 4',6'-diamidino-2-phenylindole (Porter and Feig 1980). Bacteria were counted in 10 fields on each slide at 1,000× magnification in an epifluorescence

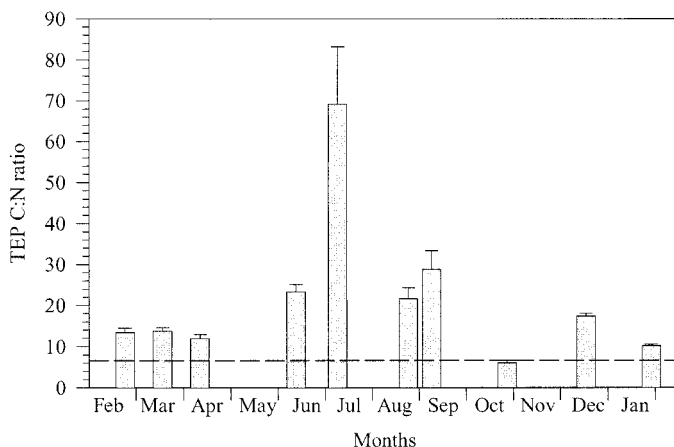


Fig. 4. Seasonal variations of TEP C:N ratios. The error bars indicate SE. The broken line represents the Redfield C:N ratio of 106:16.

microscope. The fraction of bacteria retained onto GF/F filters was estimated from bacterial counts (1) inside the bubbling column and (2) after filtration onto GF/F filters. TEP C:N ratios were calculated in terms of POC:PON corrected for bacterial carbon and nitrogen. We estimated that bacterial biomass represented between 0.6% and 9.8% of the POC ($3.3 \pm 2.9\%$; mean \pm SD) measured inside the column. Although organisms other than bacteria may occur in the 0.7 μ m (GF/F) to 1.2 μ m (GF/C) size class, we detected only cells that appeared to be heterotrophic bacteria.

The C:N ratio of TEP before and after the summer period (Fig. 4) was, on average, twice the Redfield value (11.6 ± 0.4 ; mean \pm SE; $n = 102$), and increased abruptly after the spring bloom, remaining high throughout summer (37.7 ± 5.2 ; mean \pm SE; $n = 47$), with an overall average C:N ratio of 19.9 ± 1.9 (mean \pm SE; $n = 149$). The summer increase in TEP C:N ratio coincided with the low nitrate concentration observed in the surface mixed layer.

During a previous study in the northwestern Mediterranean Sea, Copin-Montégut and Copin-Montégut (1983) reported C:N ratios for the total standing stock of particulate organic matter (POM) in the surface layer as high as 12.7 during summer. As an attempt to explain the non-Redfield behavior of POM observed, they suggested that carbonaceous compounds without nitrogen (i.e., TEP) might be more abundant when dissolved nitrogen is deficient. Furthermore, during a time-series study of sediment traps deployed at DYFAMED, Marty et al. (1994) reported a summer increase in POC flux at 200 m (with the highest value recorded during the June–July period) and observed that the C:N ratio of POM in trap samples was highest in July (C:N = 9.6). The period when both the increase in POC flux and the high C:N ratio of POM in trap samples were observed coincides with the accumulation of the TEP pool and the increase of TEP C:N ratio. This suggests that TEP, or at least the fraction of the TEP that combines with other particles to form mixed aggregates, may be found in sediment traps and contribute to the flux of sinking particles.

The relatively high C:N ratios reported for POM found in sediment traps (Marty et al. 1994) and for the total stand-

ing stock of POM (Copin-Montégut and Copin-Montégut 1983) when nitrogen is deficient further suggest that variations in the C:N of TEP could modify the C:N of both sinking and standing POM and, thus, that TEP can act as important regulators of the C:N ratio of total organic matter.

TEP source and redefinition of the TEP pool—TEP-C concentrations were compared with dissolved organic carbon (DOC) recorded during a previous study at the DYFAMED site. TEP-C concentrations were equivalent to $\sim 5\%$ of surface water DOC (Copin-Montégut and Avril 1993) during the spring bloom and up to $\sim 25\%$ of DOC during summer. In other systems, 20%–30% of oceanic DOM is high-molecular weight (HMW) dissolved organic matter—i.e., molecules $>1,000$ Da (Carlson et al. 1985; Benner et al. 1992; Amon and Benner 1994)—and the HMW fraction is carbohydrate rich (Benner et al. 1992). HMW DOM and C-rich DOM (Williams 1995) could represent the same fraction of the DOM. The average C:N ratio of TEP equals that of the HMW DOM produced by marine phytoplankton (Biddanda and Benner 1997; Kepkay et al. 1997), which suggests that TEP are formed from colloidal precursors exuded by phytoplankton. Because TEP and HMW DOM (or C-rich DOM) represent the same fraction of the DOM, have the same elemental composition, and have similar seasonal distributions, it is reasonable to assume that the polysaccharidic fraction of the HMW DOM is the source of TEP. This suggests that TEP appear in a continuum of size from molecules $>1,000$ Da to particles of hundreds of microns.

The classification of organic matter as dissolved and particulate, based on the operational criterion of size, already leads to confusion for conventional particles and is particularly questionable when one tries to define the highly dynamic pools of HMW DOM and of TEP (Kirchman et al. 1991; Mari and Burd 1998). As a consequence, we argue that the definition of this pool of carbon-rich organic matter should be extended to include both size fractions and that TEP should be redefined (without any consideration of size) as one single pool of transparent exopolymeric products.

Potential implications for the biological pump model and the water column stoichiometry—The measured C:N ratios of TEP are consistent with the net DIC:NO₃ assimilation ratios reported at the DYFAMED station during N-limiting conditions (Copin-Montégut 2000). To explain the carbon overconsumption, Toggweiler (1993) suggested that a large pool of organic matter with an anomalous C:N ratio should increase by $15\text{--}50 \mu\text{mol C L}^{-1}$ from spring bloom to late summer. We have shown here that the pool of TEP probably increased by $\sim 17 \mu\text{mol C L}^{-1}$ during the same period and that TEP have an overall average C:N ratio of ~ 20 . Both of these findings suggest that the TEP pool is indeed a product of carbon overconsumption and overproduction. As a consequence, the C:N ratio of POM is not an accurate index of the total organic matter produced and, thus, cannot be used to link the production of new organic matter to the removal of nitrate.

At this point, two main questions are raised by the introduction of TEP as a C-rich pool of POM to prime the biological pump. What mechanisms cause the formation and the

accumulation of TEP? How can the observed uptake and measured C:N ratios be reconciled with Redfield stoichiometry—i.e., what process(es) drive(s) the C:N ratio back to Redfield values? A way to reconcile the observed high C:N uptake ratio and water column stoichiometry is that the TEP pool is respired back to the atmosphere before it reaches the aphotic zone. This implies that TEP should sink slower than the rate of bacterial degradation. Since TEP are highly hydrated polysaccharidic particles likely to present a density close to that of seawater, they are supposed to sink very slowly unless they combine with other particles. Furthermore, enzymes released by bacteria attached to marine aggregates may render the aggregates soluble (Smith et al. 1992). All TEP are colonized by bacteria and the fraction of TEP-attached bacteria can represent up to 25% of the total bacterial population (Passow and Alldredge 1994; Mari and Kjørboe 1996). The ectoenzyme-mediated mineralization by bacteria may solubilize TEP and the resulting DOM may enter the microbial loop and/or coagulate to reform TEP. This “aging” of TEP as bacteria increase in number may in turn selectively remove organic carbon and regulate the C:N ratio of total organic matter, hence, returning the ratio back to values similar to that predicted by Redfield stoichiometry (Kepkay et al. 1997).

The exchanges between the pools of TEP and C-rich DOM could present a dynamic steady-state mainly controlled by the intensity of DOM production and bacterial activity, i.e. both pools should accumulate in the water column during nutrient-limiting conditions if the microbial loop cannot metabolize the excess DOM produced or solubilize the TEP formed (Mari and Burd 1998). Therefore, the nutritional status and the mixing regime of surface waters may control the relative importance of bacterial mineralization versus TEP formation for the transfer of carbon from DOM to POM. The seasonal distributions of nitrate (Fig. 1c), TEP (Fig. 2), C:N ratios (Fig. 4), and C-rich DOM (Copin-Montégut and Avril 1993; Carlson et al. 1994; Williams 1995) are all consistent with the central role that TEP play in the degradation and recycling of DOC.

We suggest that TEP could be the key intermediary during the breakdown of organic carbon in surface waters as the biological pump is primed for carbon transfer to the deep ocean. However, the significance of TEP for the vertical export of carbon will closely depend on the potential fate of these particles (i.e. aggregation-sedimentation processes, bacterial mineralization, and consumption by particle grazers or filter feeders). Because these pathways process organic matter in different ways, the relative importance of each of them will determine the efficiency of the biological pumping of TEP carbon out of the euphotic zone.

Xavier Mari, Sophie Beauvais, Rodolphe Lemée, and Maria Luiza Pedrotti

Diversity, Biogeochemistry, and Microbial Ecology group
Laboratoire d'Océanographie de Villefranche
Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer
Station Zoologique, B.P. 28
F-06234 Villefranche-sur-Mer Cedex, France

References

- ALLDREDGE, A. L., U. PASSOW, AND B. E. LOGAN. 1993. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res.* **40**: 1131–1140.
- AMON, M. W., AND R. BENNER. 1994. Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* **369**: 549–552.
- BANSE, K. 1994. Uptake of inorganic carbon and nitrate by marine plankton and the Redfield ratio. *Global Biochem. Cycles* **8**: 81–84.
- BENNER, R., J. D. PAKULSKY, M. MCCARTHY, J. I. HEDGES, AND P. G. HATCHER. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* **255**: 1561–1564.
- BIDDANDA, B., AND R. BENNER. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 506–518.
- CARLSON, C. A., M. L. BRANN, T. H. MAGUE, AND L. MAYER. 1985. Molecular weight distribution of dissolved organic matter in seawater determined by ultrafiltration: A reexamination. *Mar. Chem.* **16**: 155–171.
- , H. W. DUCKLOW, AND A. F. MICHAELS. 1994. Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature* **371**: 405–408.
- COPIN-MONTÉGUT, C. 2000. Consumption and production on scales of a few days of inorganic carbon, nitrate and oxygen by the planktonic community: Results of continuous measurements at the Dyfamed Station in the northwestern Mediterranean Sea (May 1995). *Deep-Sea Res.* **47**: 447–477.
- , G., AND B. AVRIL. 1993. Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the North-Western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res.* **40**: 1963–1972.
- , AND G. COPIN-MONTÉGUT. 1983. Stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in marine particulate matter. *Deep-Sea Res.* **30**: 31–46.
- FUKUDA, R., H. OGAWA, T. NAGATA, AND I. KOIKE. 1998. Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3352–3358.
- KEPKAY, P. E., J. F. JELLET, AND S. E. H. NIVEN. 1997. Respiration and the carbon-to-nitrogen ratio of a phytoplankton bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **150**: 249–261.
- KIRCHMAN, D. L., Y. SUSUKI, C. GARSIDE, AND H. W. DUCKLOW. 1991. High turnover rate of dissolved organic carbon during a spring phytoplankton bloom. *Nature* **352**: 612–614.
- MARCHAL, O., P. MONFRAY, AND N. R. BATES. 1996. Spring-summer imbalance of dissolved inorganic carbon in the mixed layer of the northwestern Sargasso Sea. *Tellus* **48**: 115–135.
- MARI, X. 1999. Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **183**: 59–71.

Acknowledgements

We thank P. E. Kepkay, J. R. Toggweiler, P. J. le B. Williams, and H. G. Dam for constructive comments and reviews on the developing manuscript and K. Tang and E. Rochelle-Newall for helpful discussions. We also thank M.-D. Pizay for providing the nutrient data. This research was supported by the CNRS-INSU (ATI), by the PROOF-DYFAMED program (JGOFS-France), by a doctoral scholarship to S.B. from Paris VI University and by a fellowship to X.M. from the European Commission through the BIOHAB project (EVK3-CT99-00015).

- , AND A. BURD. 1998. Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **163**: 63–76.
- , AND T. KJØRBOE. 1996. Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *J. Plankton Res.* **18**: 969–986.
- MARTY, J. C., E. NICOLAS, J. C. MIQUEL, AND S. W. FOWLER. 1994. Particulate fluxes of organic compounds and their relationship to zooplankton fecal pellets in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* **46**: 387–405.
- OBERNOSTERER, I., AND G. J. HERNDL. 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: Dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **116**: 247–257.
- PASSOW, U. 2000. Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **192**: 1–11.
- , AND A. L. ALLDREDGE. 1994. Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **113**: 185–198.
- PORTER, G. K., AND Y. S. FEIG. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943–948.
- REDFIELD, A. C., B. H. KETCHUM, AND F. A. RICHARDS. 1963. The influence of organisms on the composition of sea-water, p. 26–77. *In* M. N. Hill [ed.], *The sea*, v. 2. John Wiley & Sons.
- SAMBROTTO R. N., AND OTHERS. 1993. Elevated consumption of carbon relative to nitrogen in the surface ocean. *Nature* **363**: 248–250.
- SARMIENTO, J. L., AND U. SIEGENTHALER. 1992. New-production and the global carbon cycle, p. 317–332. *In* P. G. Falkowski and A. D. Woodhead [eds.], *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum.
- SCHUSTER, S., AND G. J. HERNDL. 1995. Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **124**: 227–236.
- SMITH, D. C., M. SIMON, A. L. ALLDREDGE, AND F. AZAM. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* **359**: 139–141.
- TOGGWEILER, J. R. 1993. Carbon overconsumption. *Nature* **363**: 210–211.
- WILLIAMS, P. J. LE B. 1995. Evidence for the seasonal accumulation of carbon-rich dissolved organic material, its scale in comparison with changes in particulate material and the consequential effect on net C/N assimilation ratios. *Mar. Chem.* **51**: 17–29.
- ZHOU, J., K. MOPPER, AND U. PASSOW. 1998. The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1860–1871.

Received: 18 September 2000

Accepted: 18 June 2001

Amended: 20 July 2001

Limnol. Oceanogr., 46(7), 2001, 1836–1843
© 2001, by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc.

Multispectral in situ measurements of organic matter and chlorophyll fluorescence in seawater: Documenting the intrusion of the Mississippi River plume in the West Florida Shelf

Abstract—We performed multispectral, in situ fluorescence measurements of detrital colored organic matter (COM) and chlorophyll *a* (Chl *a*) in surface waters of the West Florida Shelf using the Wet Labs spectral absorption and fluorescence instrument (SAFIre). Continuous underway measurements allowed simultaneous mapping of the dispersal pattern of riverine organic material and Chl *a* on the shelf. We used two fluorescence emission ratios to differentiate between riverine and marine COM. The data showed unusually high concentrations of COM offshore. These were attributed to an offshore extension of the Mississippi River plume. Comparisons between in situ Chl *a* concentrations measured with the SAFIre and Chl *a* values obtained from the sea-viewing wide field-of-view sensor (SeaWiFS) satellite data using OC4 and MODIS algorithms showed that, although both algorithms overestimated Chl *a*, MODIS performed better than OC4, particularly in areas with high COM concentrations. Analysis of the relationship between Chl *a* and COM concentrations within the study area showed regional variability probably caused by differences in river source.

Accurate determinations of marine chlorophyll *a* (Chl *a*) and colored dissolved organic matter (CDOM) concentra-

tions using satellite color-sensor data are essential for our understanding of the global carbon cycle and its implications in modifying world climate. CDOM is a major impediment to accurately estimating Chl *a* concentrations in coastal regions from satellite ocean color sensors (Carder et al. 1989; Müller-Karger et al. 1989). The major source of CDOM in coastal waters is river runoff of terrigenous organic matter. Away from continental margins, the effect of rivers declines and CDOM is mostly composed of material produced in the oceans. Phytoplankton growth (Carder et al. 1989; Siegel and Michaels 1996) and zooplankton grazing (Mormzikoff et al. 1994) produce new CDOM, whereas photodegradation is the major destructive pathway (Kouassi and Zika 1990; Kieber et al. 1989). These in situ processes result in changes in CDOM concentrations and could alter its optical properties. Understanding these changes has obvious implications in the study of the carbon cycle and in the determination of Chl *a* concentrations from satellite color sensors.

Several spectroscopic techniques can be used to study the optical properties of CDOM. Studies using high-resolution fluorescence spectroscopy demonstrate that CDOM fluorescence excitation and emission maxima (Ex_{max} - Em_{max}) are de-

Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea

S. Beauvais, M. L. Pedrotti*, E. Villa, R. Lemée

Marine Microbial Ecology Group, LOV, UMR 7093-CNRS, Observatoire Océanologique,
BP 28, Villefranche-sur-mer 06234 Cedex, France

ABSTRACT: Seasonal abundance, volume, size distribution and carbon content of transparent exopolymeric particles (TEP) were examined in 2 hydrologically distinct sites in the NW Mediterranean (NWM) Sea: a coastal (Point B, Villefranche Bay) and an offshore (DYFAMED, France, JGOFS) site. TEP concentration varied from 0.2 to 2.2×10^5 particles ml^{-1} , and was higher offshore. The TEP pool was low during the winter mesotrophic period and increased after the spring bloom, remaining relatively high throughout summer at both sites. The increase in TEP abundance during the oligotrophic period was relatable to nitrate limitation and a decline in primary production. TEP formation in spring was associated to a nanoflagellate bloom, while the build-up of a large pool of TEP in summer occurred in the presence of a phytoplankton community dominated by picoplankters and during strong thermal stratification, limiting vertical sedimentation. In the NWM Sea, when the TEP carbon pool (TEP-C) is high, it may represent up to 22 % of the total organic carbon, and reach down to 1 % when it is low, suggesting that the particles play a significant role in the carbon cycle. In the NWM Sea, the trophic status of the system and the composition of primary producers control TEP formation. Hydrological processes appear to be of primary importance in governing seasonal TEP distribution.

KEY WORDS: Transparent exopolymer particles · TEP · POC · DOC · Oligotrophy · Hydrological processes

—Resale or republication not permitted without written consent of the publisher—

INTRODUCTION

Transparent exopolymeric particles (TEP) are formed abiotically by spontaneous coagulation of the colloidal fraction of dissolved organic polysaccharides, substances exuded by phytoplankton and bacteria (Alldredge et al. 1993, Passow & Alldredge 1994). These non-living organic particles are flexible, transparent and fragile, and thus estimating their concentration requires specialized techniques. Although there are difficulties in comparing TEP concentrations when different data collection methods are used, the particles appear to be ubiquitous in the oceans (Passow & Alldredge 1994, Mari & Kiørboe 1996, Ramiah et al. 2001) as well as in freshwaters (Grossart et al. 1997).

TEP have received a great deal of attention over the past 10 yr (Alldredge et al. 1993, Schuster & Herndl 1995, Engel & Passow 2001), testifying to their potential importance in several biogeochemical processes. TEP form the organic matrix of marine snow, enhancing vertical fluxes of organic matter (Smetacek 1985, Passow et al. 2001) and carbon export from the surface ocean (Fowler & Knauer 1986, Engel 2002). Due to their high stickiness, these particles aggregate with each other and with detritus (Kiørboe & Hansen 1993), favouring flocculation and sedimentation of non-living matter. Moreover, TEP and derived aggregates serve as substratum and microhabitats for attached bacteria (Passow & Alldredge 1994, Mari & Kiørboe 1996) and could be a direct source of carbon for higher trophic levels via protists, microzooplankton and even nekton,

*Corresponding author. Email: pedrotti@obs-vlfr.fr

such as larval fish (Grossart et al. 1998, Passow & Allredge 1999). If TEP are consumed, they represent a direct transfer of energy from dissolved matter to higher trophic levels, **by passing** the microbial loop. While the role played by TEP in the cycling of carbon is not under doubt, the importance of this role is uncertain. Consequently, knowledge concerning the occurrence and abundance of TEP in the field is of primary importance to correctly assess the relative importance of different stocks and fluxes of carbon in the pelagic ecosystem.

In the NW Mediterranean (NWM) Sea, at a French JGOFS time-series station (DYFAMED), Mari et al. (2001) showed that the formation of a carbon-rich TEP pool with a high C:N ratio could explain the carbon over-consumption observed in this area (Copin-Montégut & Avril 1993). In this paper we report the seasonal distribution of TEP in this offshore station, and we compare the temporal distribution patterns with a coastal site (Point B, Villefranche Bay) in the same area. There are few annual surveys of TEP distribution, especially in a meso-oligothrophic area such as that of the NWM Sea (see review of **Passow 2002**).

The aims of this study were to (1) describe the seasonal variability in abundance and characteristics (size frequency, C:N ratio and carbon content) of TEP, and relate this variability to hydrological conditions and the prevailing status of 2 meso-oligothrophic systems; and (2) evaluate the TEP pool in relation to other organic carbon pools at DYFAMED in order to assess the potential importance of TEP in the carbon cycle.

MATERIALS AND METHODS

Study sites. This study was carried out in the NWM Sea (Fig. 1) from February 1999 to February 2000 at 2 sites: (1) Point B ($43^{\circ}41'10''\text{N}$, $07^{\circ}19'0''\text{E}$), in the coastal zone located at the entrance of Villefranche Bay and influenced by the Liguro-Provençal current, resulting in continual water renewal (Nival & Corre 1976). The Bay is subject to the influence of a cyclonic current running from east to west along the French Riviera. In normal conditions, a branch of the Ligurian Current flowing westward offshore enters the **surface** of the Bay. Near the coast, the average water

speed in the surface layer can reach 20 cm s^{-1} (Béthoux et al. 1988); and (2) DYFAMED ($43^{\circ}25'2''\text{N}$, $07^{\circ}51'8''\text{E}$), an offshore site where seasonal hydrological features are well documented, as it is a French JGOFS time-series station. The DYFAMED station, located in the central part of the Ligurian Sea, is predominantly influenced by **vertically advective** currents and is considered as an oceanic site. At DYFAMED, maximal winter-downwelling speed is ca. $10\text{ to }15\text{ cm s}^{-1}$, while the speed during the stratification period is ca. 0.2 cm s^{-1} (Béthoux & Prieur 1983). Horizontal water fluxes **could be neglected** due to cyclonic circulation and the Ligurian frontal system that acts as a physical barrier (Béthoux et al. 1988, Sournia et al. 1990). Advection is very weak, and the current speed (3 cm s^{-1}) is generally below the minimum detectable level of current meters (**Andersen & Prieur 2000**).

Sampling. Water samples for TEP analysis were collected monthly using an acid-washed 30 l Niskin bottle (General Oceanics) at the depth of the chlorophyll maximum (DCM) layer previously determined by a flu-

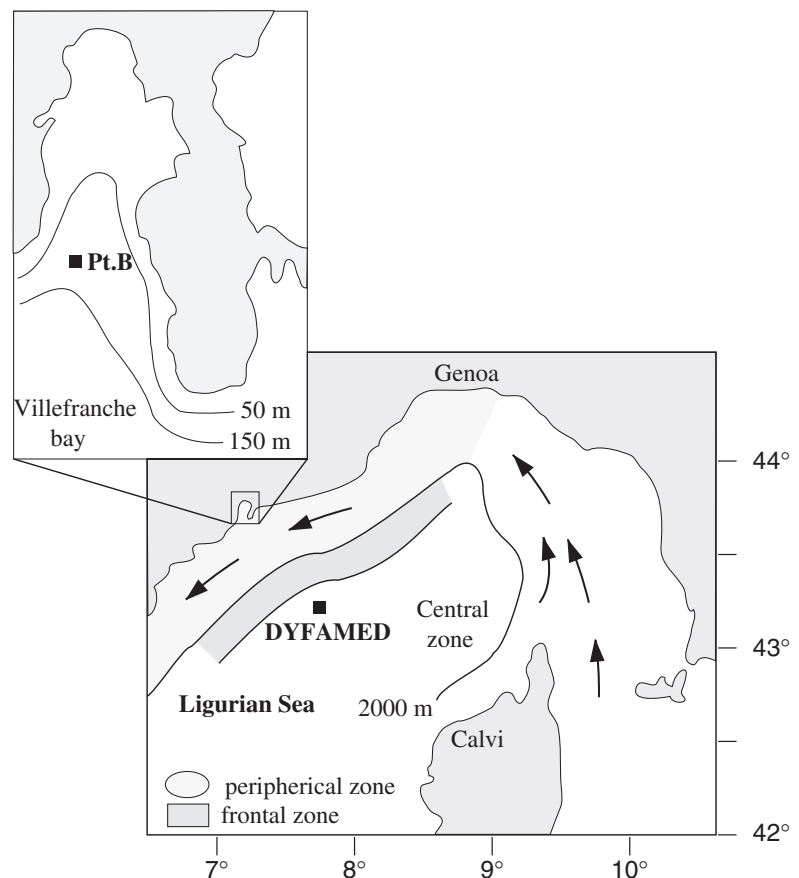


Fig. 1. Location of sampling sites. DYFAMED, the open-sea site in the central zone of the Ligurian sea, and Point B (Pt.B), at the entrance of Villefranche Bay (France). Arrows represent the Ligurian Current

orimeter coupled with a CTD Seabird (SBE 25) probe. CTD casts were used on each sampling date to describe the vertical stratification of physical and chemical parameters. Depths of sampling for pigment and nutrient analysis were 5, 10, 30, 50 and 75 m at Point B and 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 110 and 130 m at DYFAMED. Nitrate and phosphate concentrations were determined using an autoanalyzer, according to the Tréguer & Le Corre (1975) method. Chl *a* concentrations were measured at Point B by spectrophotometry, and at DYFAMED by HPLC, following the method of Vidussi et al. (1996). Primary production (PP) was determined by *in situ* ^{14}C -bicarbonate incorporation according to Dandonneau & Le Bouteiller (1992). The correction factor described by Moutin et al. (1999) was used to convert PP rates obtained during the 4 h incubations to daily (24 h) rates. Data of PP ($\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) come from the DCM layer as TEP. All samples for TEP analysis were prepared fresh, on board, within the 2 h following sampling.

Staining procedure and enumeration of TEP. TEP were studied following the method of Passow et al. (1994). Several seawater aliquots (5, 10 and 15 ml) were gently filtered through 0.2 μm NucleporeTM filters under constant low pressure. TEP retained on the filter were stained with 500 μl of a solution of 0.06 % acetic acid (pH 2.5) and 0.02 % Alcian blue 8GX (Hopkin & William). Since Alcian blue, a specific stain for negatively charged polysaccharides, may precipitate in the presence of salts, it may produce artifacts that could be mistaken as TEP. To avoid this occurring, materials were rinsed with distilled water between consecutive filtrations, and the dye was tested before each experiment with artificial seawater at 38.2 ‰ (SIGMA), twice filtered onto a 0.2 μm filter. Blanks didn't show a significant presence of TEP. After the staining procedure, TEP were transferred to a microscope slide using the filter-transfer-freeze technique (Hewes & Holm-Hansen 1983). During winter 1999/ 2000, filters containing TEP were also mounted directly on a white slide (Cyto-Clear®), providing direct observations of TEP (Logan et al. 1994).

TEP were observed through an Axiophot-Zeiss microscope. Pictures were captured with a CCD colour video camera (COHU 2252-1040, 752×582 pixel resolution, 0.08 lux minimum sensitivity). TEP were counted using Image Pro Plus 4 software. A minimum of 600 TEP were counted and sized at 3 successive magnifications (100 \times , 200 \times , 400 \times), in order to better cover the entire size spectra (Mari & Burd 1998). The equivalent spherical diameter (ESD) of each TEP was calculated from the measurement of its cross-sectional area by means of a semi-automatic image-analysis system. Counts were classified, according to their ESD, into 15 logarithmic size classes between 1 and 135 μm .

Size distribution and TEP volume. TEP size distribution follows a classical power law usually used to describe the distribution of ocean particles (Sheldon et al. 1972), which is defined by the equation from Mac

$$dN/d(d_p) = k d_p^{-\delta} \quad (1)$$

where dN is the number of particles per unit volume, with a diameter ranging from d_p to $[d_p + d(d_p)]$, with d_p being the projected spherical encased diameter. The constant k depends on particle concentration, and the slope δ gives indications about the abundance of small particles relative to those of larger ones. k and δ were calculated using linear regression of $\log[dN/d(d_p)]$ versus $\log(d_p)$. Differences between the slopes of regression lines were statistically compared using analysis of covariance (ANCOVA), performed using SYSTAT software. Application conditions (normality of residuals, homoscedasticity and linearity) were also tested to ensure that they conformed to the assumptions of parametric statistics: no transformations were required. The number of TEP ml^{-1} was normalized by the length of the considered size class (μm). TEP volume concentrations are given in ppm.

TEP carbon and nitrogen measurements. In the sea, TEP are associated with the other suspended particles (phytoplankton cells, detritus, etc.) in the same size ranges, which make separate chemical analysis impossible. To estimate the TEP C:N ratio of Point B samples, TEP were produced by bubbling their precursors (high molecular-weight dissolved organic matter, colloids) from GF/C-filtered water. This method accelerates TEP formation, allows their isolation, and finally permits their chemical characterization (Mari 1999). After bubbling TEP samples for carbon and nitrogen, determinations were collected onto GF/F filters (nominal pore size 0.7 μm). The experimental protocol is detailed, and the filtration steps are justified in Mari et al. (2001).

Estimation of organic carbon pools: TEP, dissolved organic carbon (DOC), particulate organic carbon (POC) and C-phytoplankton. TEP are fractal aggregates (Alldredge et al. 1993). As is typical of fractal structures, their porosity increases with increasing aggregate size, resulting in reduced mass per unit volume as the particles get larger. TEP carbon content is then linked to the size of the considered particle. In our study, it was determined from the size frequency-distribution of TEP sampled *in situ* using the size-dependent relationship proposed by Mari (1999):

$$\text{TEP-C} = 0.25 \sum_i n_i r_i^{2.55} \quad (2)$$

where TEP-C is given in $\mu\text{g C ml}^{-1}$, n_i is the concentration of particles in size class i , and r_i is the TEP radius (μm) in the same size class.

We compared TEP-C to other organic carbon reservoirs at the depth of the DCM at DYFAMED. Data of DOC come from Avril (2002). As DOC is conservative for this area, the DOC dataset is the result of a composite annual-cycle average-distribution over 40 monthly profiles. Data of POC and **particulate organic nitrogen (PON)** were obtained from the JGOFS database. They come from the same samplings dates as the TEP. Concentrations were determined by high-temperature oxidation using a Heroes CHN-O-Rapid analyzer (Miquel et al. 1994). The portion of organic carbon **due to** phytoplankton (C-phytoplankton) was determined by plotting POC data ($\mu\text{g l}^{-1}$) against chl *a* data (mg m^{-3}) (Marty et al. 2002). Total data of POC, DOC, primary production and chl *a* concentrations are available from the JGOFS-France database, available at www.obs-vlfr.fr/jgofs/html/bdjgofs.html.

RESULTS

Hydrological features

DYFAMED site

In winter, due to strong vertical mixing, temperature was homogeneous with depth (13°C) to 200 m. In summer, the water column was well stratified with a marked pycno- and thermocline between 20 and 45 m that isolated surface waters from the deeper waters. The transition between mixed and stratified periods occurred during spring and early winter (Fig. 2a). The winter period was relatively rich in nutrients (with nitrate and phosphate concentrations of 3 to 4 and 0.15 to $0.20 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively) in the surface layer. From April to late autumn, surface water became depleted in nutrients, the nitrate concentration decreased **to below** $0.5 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Fig. 2c), and phosphates reached undetectable levels. The seasonal distribution of chl *a* (Fig. 2e) was characterized by a first phytoplankton bloom ($2.9 \mu\text{g chl } a \text{ l}^{-1}$) at the beginning of March in the surface mixed layer, and a second one in June on the pycnocline layer (up to $1.2 \mu\text{g chl } a \text{ l}^{-1}$).

Point B site

In winter the water column was well mixed and the **temperature was 13°C** (Fig. 2b). From May to September 1999, the water column was stratified, with the thermocline well established at ca. 30 m depth (Fig. 2b). An increase in nitrate concentration occurred in March, earlier than in oceanic areas, with a maximum of $2 \mu\text{mol l}^{-1}$, and was followed by a phytoplankton bloom ($1.05 \mu\text{g chl } a \text{ l}^{-1}$). During summer, the

nitrate concentration was below $0.4 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Fig. 2c). Phosphate concentrations reached maximum values of $0.12 \mu\text{mol l}^{-1}$ in April, July and December; the rest of the year the concentration was below $0.09 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Seasonal distribution of TEP: abundance and volume

From February to May, the TEP abundance at DYFAMED and Point B remained low (under $0.35 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$, Fig. 3). At DYFAMED, the TEP abundance increased strongly in June, reaching a maximum value of $2.2 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$, and remained high until the autumn.

At Point B, the TEP concentration was high from June to September, attaining a maximum value of $0.55 \times 10^5 \text{ TEP ml}^{-1}$ in July. At both sites, TEP abundance decreased in autumn to the same values observed the previous winter.

The annual distribution of TEP concentration by size class is shown in Figs. 4 & 5. At DYFAMED, TEP volume concentrations were low during winter and increased in April to reach a peak in June (Fig. 4a). After a decrease in July, the TEP volume concentration showed a second peak in August. In summer, most of the total TEP volume was made up of particles ranging from 4 to $12 \mu\text{m}$ in diameter (more than 74%). In autumn, the TEP concentration decreased for all size classes to reach the same values as before the spring bloom. At Point B, TEP volumes were lower than at DYFAMED (Fig. 4b). A peak was observed in March; from March to September the TEP volume was made up mostly of particles ranging from 5 to $17 \mu\text{m}$ in diameter (>50%).

TEP volume concentrations pooled for hydrological seasons are shown in Fig. 5. Maximum TEP volume occurred during summer and early autumn at DYFAMED, reaching 0.20 to $0.24 \text{ ppm } \mu\text{m}^{-1}$. During the rest of the year, TEP volumes were relatively low ($<0.06 \text{ ppm } \mu\text{m}^{-1}$). At Point B, TEP volume concentrations were highest in spring ($0.25 \text{ ppm } \mu\text{m}^{-1}$). The summer–autumn period showed intermediary values, with volume concentrations of $0.15 \text{ ppm } \mu\text{m}^{-1}$, and in winter the TEP volume was low, with the same value as at DYFAMED during the same period. We observed a larger size range at Point B ($\text{ESD} < 135 \mu\text{m}$) compared to DYFAMED, where the TEP size didn't exceed $100 \mu\text{m}$.

TEP size spectra

The size spectra at both sites (Fig. 6) were similar, and followed a power-law distribution. However, the smallest size classes ($<1.5 \mu\text{m}$) appeared to be under-

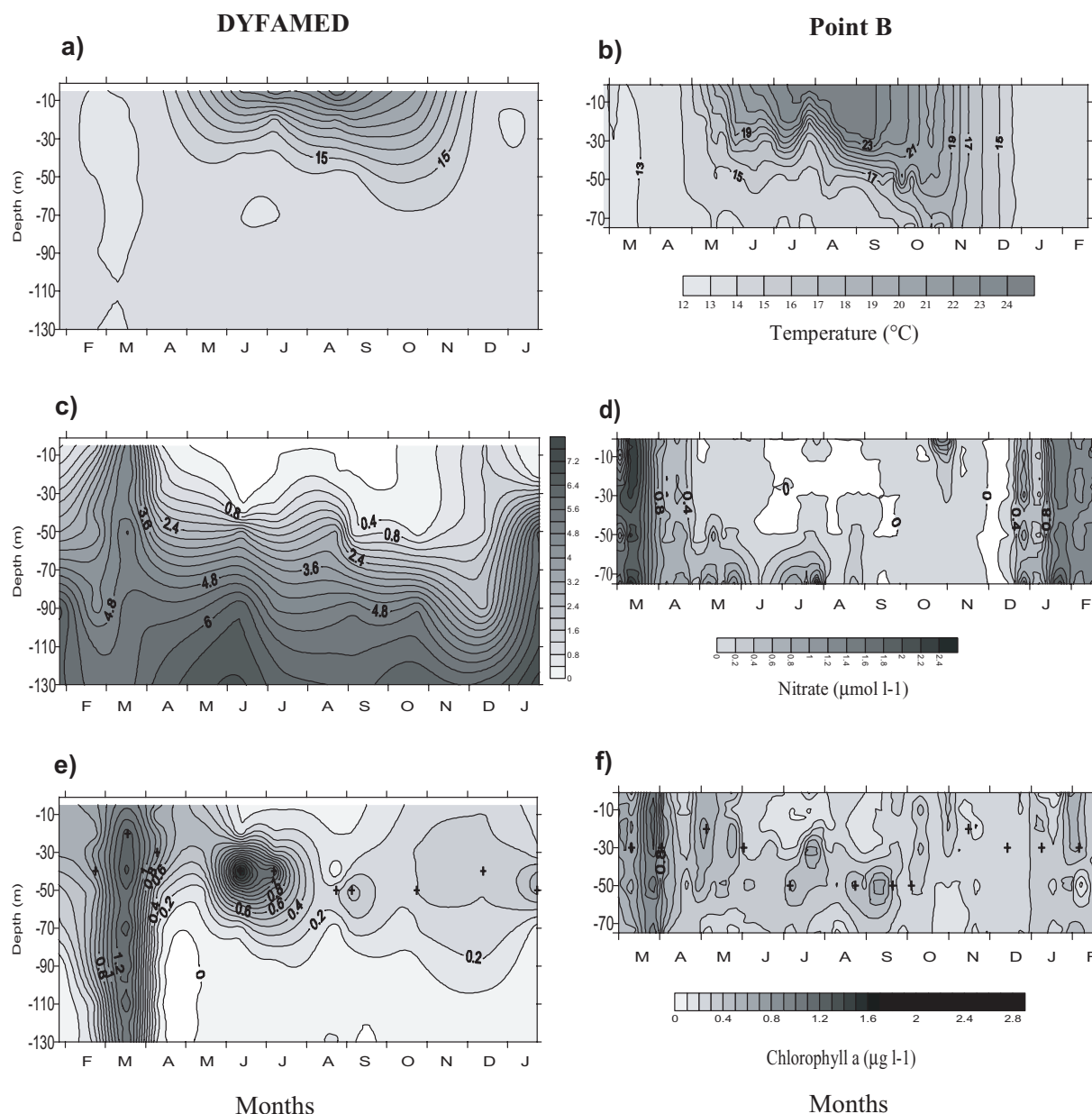


Fig. 2. Seasonal water column variations of temperature (a, b), nitrate (c, d) and chl a concentrations (e, f) (crosses show transparent exopolymeric particle sampling depths). Data come from DYFAMED-JGOFS-France and INSU-SOMLIT programs (1999/2000). Note: scales are different for nitrate concentration

estimated. This deviation is probably due to sampling artifact. Indeed, even if the TEP count method used in this study is the best available, the filtration method may miss small particles which pass through filter pores due to the flexible character of TEP (Alldredge et al. 1993).

We tested for a season- or site-effect on the size distribution of TEP. Results of ANCOVA for the size spectra between DYFAMED and Point B sites did not sig-

nificantly differ ($p > 0.5$; $df = 1;134$). As size distribution of TEP was not influenced by the location, data were pooled together for further testing. Results showed that seasonal differences were highly significant ($p < 0.005$, $df = 2;125$). Fig. 7 illustrates that the observed **size spectra resulted from ANCOVA** with data from both sites pooled. Slopes of regression lines were -2.13 ± 0.12 for the spring, -2.85 ± 0.11 for the stratified period, and -3.20 ± 0.14 for the winter period.

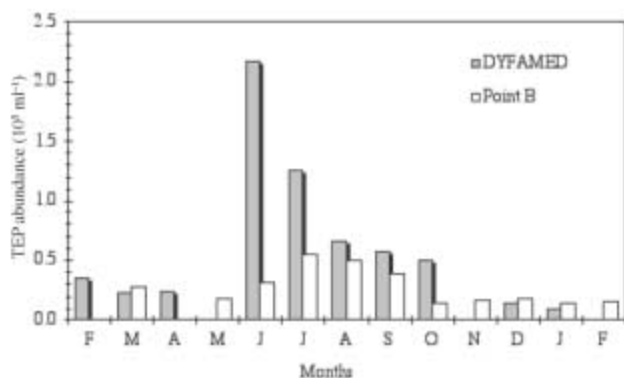


Fig. 3. Variation in transparent exopolymeric particle (TEP) abundance ($\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), from February 1999 to February 2000, in the NW Mediterranean Sea at DYFAMED and Point B. Missing data correspond to a missed cruise due to bad weather conditions

TEP contribution to the organic carbon pool

The molar C:N ratio of TEP varied with time at Point B from 5.6 ± 0.2 to 80.5 ± 7.2 . The TEP C:N ratio increased from June to reach a maximum peak in July, and remained high in August (Fig. 8). The C:N ratio of TEP at DYFAMED followed the same pattern as that at Point B, with higher ratios during summer (73 in July). The C:N ratio of particulate organic matter (POM) at DYFAMED in the DCM layer varied from 6.2 to 14.3. The C:N ratio of TEP was higher than the C:N ratio of POM, and higher than the Redfield ratio over almost the entire year.

The carbon contained in TEP (TEP-C) at Point B ranged from $1.99 \mu\text{mol C l}^{-1}$ in February to a maximum of $13.09 \mu\text{mol C l}^{-1}$ in March, which coincided with the phytoplankton bloom (Table 1), while in DYFAMED a higher carbon content of TEP was found in summer. POM at DYFAMED at the DCM layer ranged from 3.70 to $10.35 \mu\text{mol C l}^{-1}$, and dissolved organic matter (DOC) ranged from 70 to $84 \mu\text{mol C l}^{-1}$. We attempted to estimate the TEP-C in relation to other organic pool in the NWM Sea. We summed the values of POC and DOC at DYFAMED for each TEP sampling period to generate a value for total organic carbon

(TOC). At Point B, the TEP-C pool represented from 2 to 15% of the TOC. The TEP-C pool at DYFAMED represented up to 22% of the TOC during the summer period, and fell to 1% when TEP formation was low.

The relationship between POC and chl *a* at DYFAMED was described by a linear regression ($y = 44.7x + 36.2$) estimated from plots of data from 1999 at the layer of maximum chl *a*. The slope of the regression line gives a C:chl *a* ratio of 45 ($R^2 = 0.7$; $df = 7$; $p < 0.05$; data not shown). Based on our calculations and conversion factors, the TEP-C concentration exceeded the algal POC concentration almost throughout the year at both sites.

From February to April 1999, during the nutrient-enriched period, PP was high (ca. $0.4 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and the TEP-C concentration was low (Fig. 9). In June, after the phytoplankton bloom, the PP decreased abruptly to reach $0.18 \mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, while the TEP-C concentration increased until its maximum ($20.51 \mu\text{mol C l}^{-1}$) and remained high during the nutrient-depleted period. From October, with the re-injection of nutrients to the surface, PP increased and TEP-C decreased.

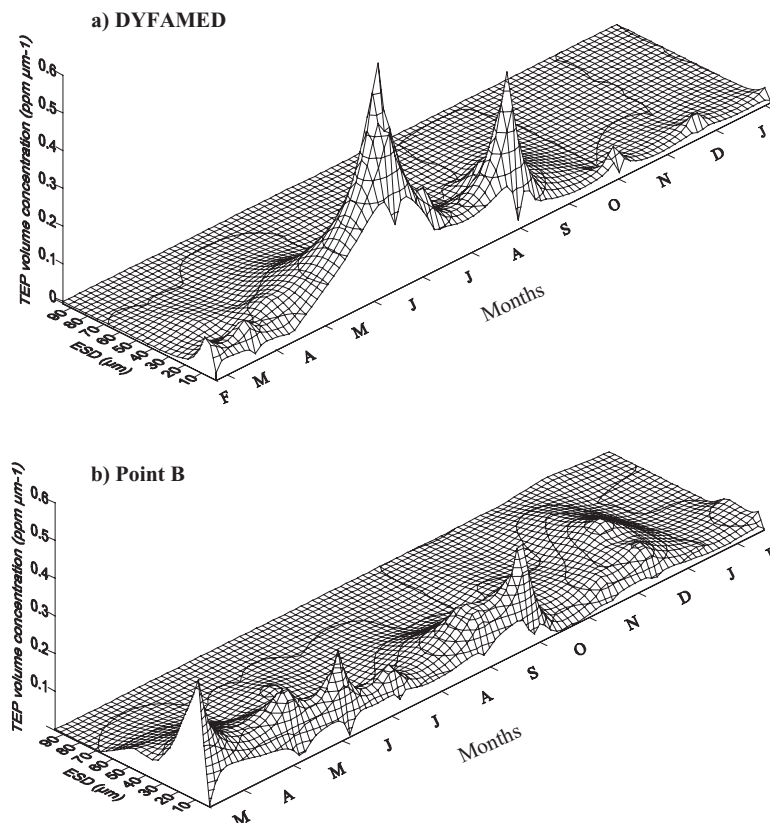


Fig. 4. Three-dimensional representation of transparent exopolymeric particle (TEP) volume concentration per size-class ESD (equivalent spherical diameter) at DYFAMED (a) and Point B (b), from February 1999 to January 2000

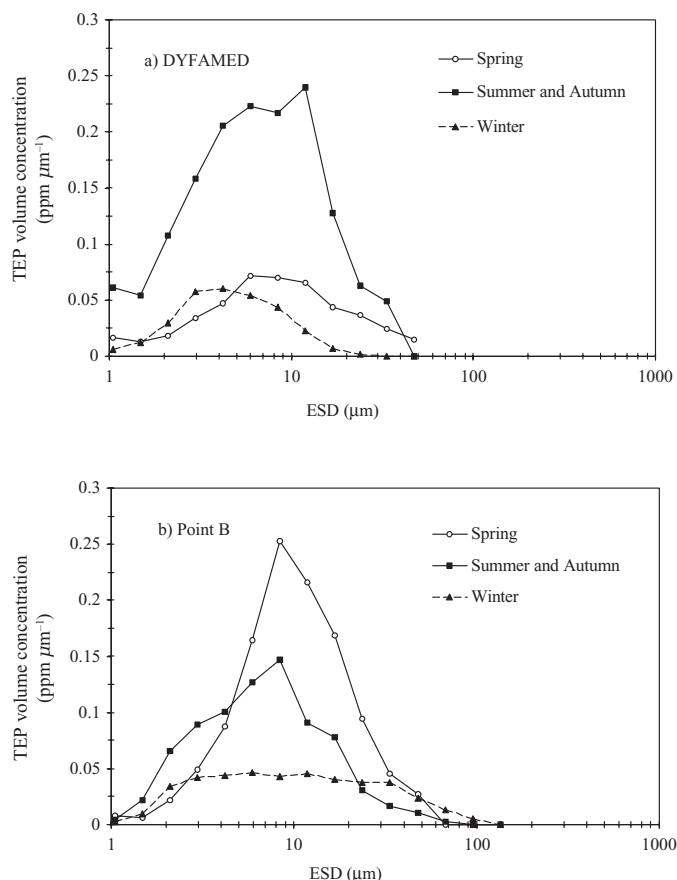


Fig. 5. Seasonal mean distribution of transparent exopolymeric particle (TEP) volume concentration at DYFAMED (a) and Point B (b), from February 1999 to January 2000. Summer and autumn were pooled as a stratified period. The equivalent spherical diameter (ESD) is presented in log scale

DISCUSSION

Abundance of TEP and seasonal patterns

In our study, TEP were found in relatively high abundances (2×10^4 to 2.2×10^5 TEP ml^{-1}) at every sampling occasion, both at coastal and offshore sites. We found TEP concentrations to be 1 to 3 orders of magnitude higher than those reported for a variety of systems. For example, in the northern Adriatic Sea, Schuster & Herndl (1995) found from 600 to 10^3 TEP ml^{-1} in oligotrophic and mesotrophic stations, respectively. Passow & Alldredge (1994) found from 4 to 5×10^3 TEP ml^{-1} in the surface waters of 2 coastal stations of California, and less than 10 TEP ml^{-1} in a deep oceanic site off Bermuda. Our high values likely reflect the methodology used. We observed TEP at 3 successive magnifications, and counts were made by employing image analyses software, allowing semi-automated counts (Mari & Burd 1998). We

also used a direct filtration with Cyto-Clear slides, so small TEP were observed more accurately. Such techniques permit quantification of TEP smaller than 3 or 5 μm . Our TEP concentration values were comparable to those found in the Kattegatt (up to 3.8×10^5 TEP ml^{-1} , Mari & Burd 1998), and in a subarctic ria of Japan (up to 3.4×10^5 ml^{-1} , Ramaiah et al. 2001). Interestingly, those sites were highly eutrophic ($12 \mu\text{g chl a l}^{-1}$ during the spring bloom), while the NWM Sea is an oligomesotrophic sea. As TEP are mainly formed by phytoplankton exudates (Alldredge et al. 1993), it is likely that TEP formation is rather linked to the phytoplankton activity than to the standing stock of phytoplankton (Schuster & Herndl 1995).

In our study, TEP were more abundant at the offshore site, where chl *a* content was higher, compared to the coastal site. At DYFAMED, total TEP abundance was correlated with the DCM chl *a* concentration ($R = 0.71$; $p < 0.05$; $\text{df} = 9$). But focusing on each TEP size-class, we observed that only the smaller TEP class ($\leq 2 \mu\text{m}$) showed a positive correlation with chl *a* ($R = 0.82$, $p < 0.01$, $\text{df} = 9$). In June, during the phytoplankton bloom, 46 % of TEP belong to the small size classes ($< 1.25 \mu\text{m}$), while in August 65 % of TEP were larger TEP (2.5 to $10 \mu\text{m}$). We can hypothesize that small TEP were probably newly formed, and consequently they were nearer (in terms of space and time) to their phytoplanktonic source. While there is a general decrease in abundance (number of TEP ml^{-1}) from spring to summer, the volume of TEP increases after the spring bloom and remains relatively high throughout the summer. This could be explained by the evolution of TEP size-frequency from small toward larger particles, suggesting that aggregation processes occur during summer. At the coastal station, there was no correlation between TEP and chl *a*. At this site, high TEP volume was observed in spring following the March bloom, suggesting aggregation by coagulation between TEP and algal cells. The hydrology of the coastal area is more complex since it is influenced by coastal winds and the Ligurian Current, while the DYFAMED site is regarded as a 1D station, where horizontal advection is minor.

TEP size spectra showed a power-law function from each sampling, and were consistent with the coagulation model (power-law function, slopes of ca. 3, Mac Cave 1984). They are thought to be primarily formed by coagulation of colloidal precursors (Mari & Burd 1998). Over the whole the year, pooling both sites, slopes of pooled data were 2.13 (spring), 2.85 (stratified period) and 3.20 (winter). The regression slope was the highest in the winter period, meaning that smaller particles were relatively more abundant than larger ones compared to spring and summer periods. Deviations from the theoretical slope ($\delta = 3$) could be explained by biological and physical processes. The strong water mixing during winter could desegregate TEP into smaller particles. Indeed,

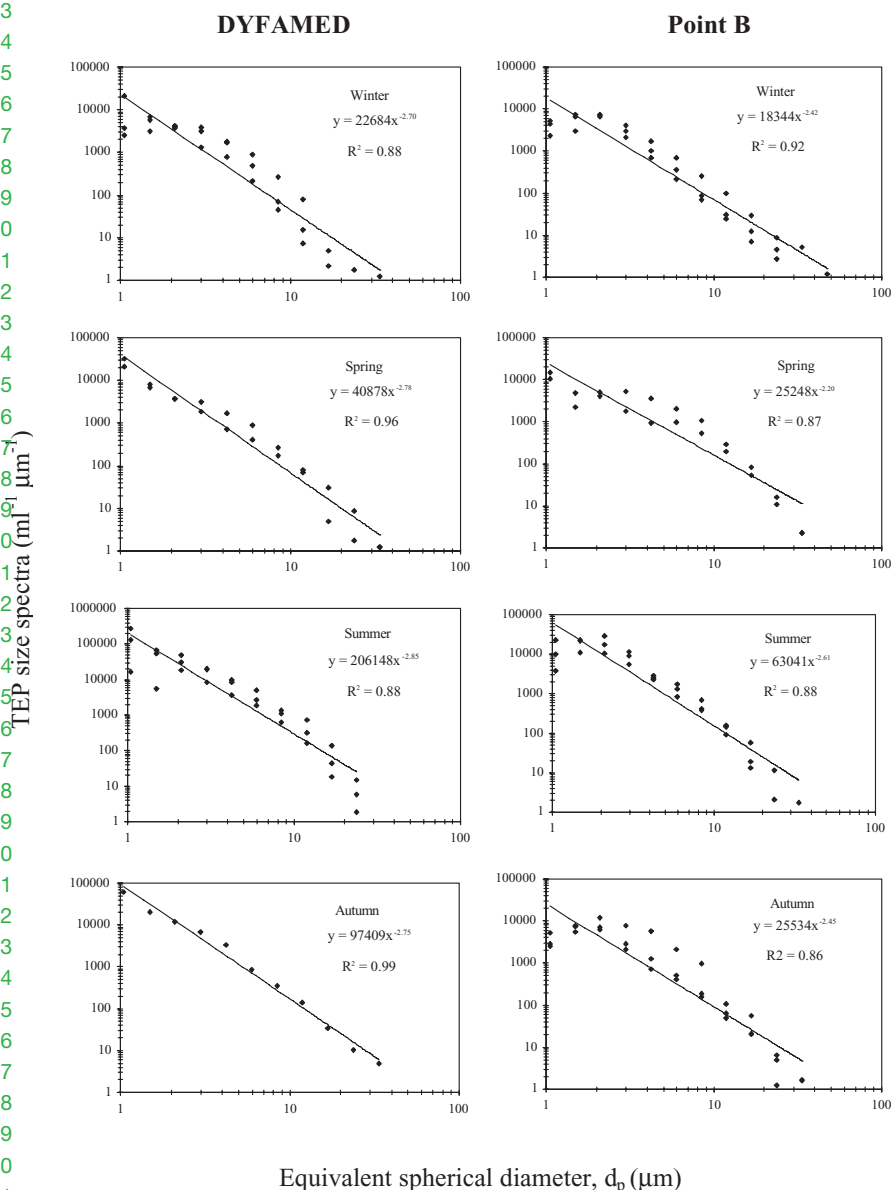


Fig. 6. Transparent exopolymeric particle (TEP) size spectra with log-log transformation, at DYFAMED and Point B. Regression lines ($dN/d[d_p] = kd_p^\delta$) have been fitted to the data. Graphs show all monthly data averaged by season (see 'Size distribution and TEP volume' for equation details)

according to Passow & Alldredge (1994), fragmentation or desegregation processes lead to a steeper slope.

TEP contribution to the carbon cycle

Based on the stoichiometric model of Redfield (1963), Sambrotto et al. (1993) distinguished conditions of elevated carbon consumption relative to nitrogen that exceeded the Redfield C:N ratio. Using the C:N ratio to

convert new production to carbon can underestimate net organic carbon production by more than 50%. This 'spring–summer imbalance of dissolved inorganic carbon' has been reported for different marine systems (Banse 1994, Marchal et al. 1996, Copin-Montégut 2000, Körtzinger et al. 2001). The explanation for such an apparent carbon overconsumption by phytoplankton was held in the formation of a large standing stock of organic matter, with an abnormal C:N ratio, that accumulated in the euphotic zone from spring bloom to late summer (Copin-Montégut & Avril 1993, Toggweiler 1993, Carlson et al. 1994, Williams 1995).

Mari et al. (2001), using a subset of the data analyzed here, showed that the measured C:N ratios of TEP at the DYFAMED station during N-limiting conditions (in 1999) are consistent with the net DIC:NO₃ assimilation ratios reported for the same area by Copin-Montégut (2000). Our results at the coastal site confirmed this general pattern, with an increase in the TEP C:N ratio from June to reach a maximum value in summer (80), with an average C:N molar ratio of 22. Based on those results, the C:N ratio of the POM is not an accurate index of the total organic matter produced, and thus cannot be used to link the production of new organic matter to the amount of atmospheric CO₂ transferred to the ocean's surface.

Our results showed that at the DYFAMED and Point B sites, during the oligotrophic period, the increase in TEP abundance is relatable to nitrate limitation and a decline in primary production. Experimental evidence supports the idea that N or P limitation influence phytoplankton extracellular release (Myktestad 1977, Obernosterer & Herndl 1995, Penna et al. 1999). With regard to TEP directly, a link between TEP production and N-limitation was shown *in vitro* by Corzo et al. (2000), using diatom cultures. In mesocosm experiments, Engel et al. (2002) documented a **decoupling of carbon dynamics** from **that of** nitrogen and phosphorus after nitrate depletion, with a **resultant** large flow of carbon into the TEP pool and an elevation of the POC:PON ratio. In field studies, Mari & Burd

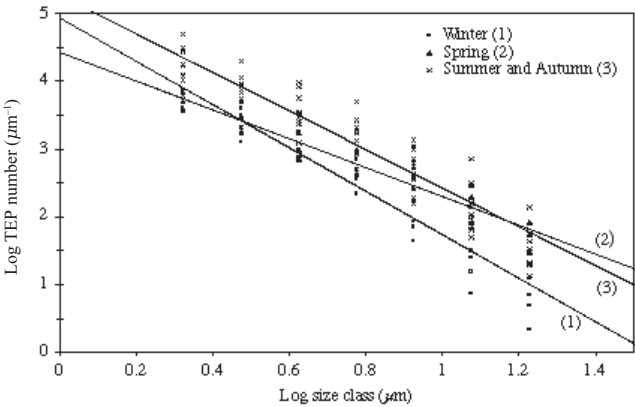


Fig. 7. Results of transparent exopolymeric particle (TEP) size spectra ANCOVA. DYFAMED and Point B data were pooled together for different seasons ($p = 0.19$; $n = 137$). (1), (2) and (3) regression lines correspond to the winter, spring and summer–autumn (= stratified) periods, respectively

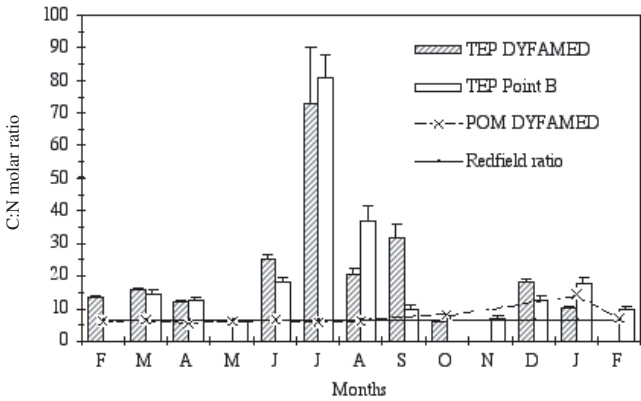


Fig. 8. Molar C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) from March 1999 to February 2000 at Point B and DYFAMED (from Mari et al. 2001). The molar C:N ratio of particulate organic matter (POM) at DYFAMED and the Redfield ratio are also represented

(1998) found evidence for increased TEP abundance when nutrients were low in the surface mixed layer in the Kattegat.

However, our study is the first to assess in-the-field links between TEP and primary production. Our data suggest that the relationships are not simply linear. Results shown in Fig. 9 suggest a temporal uncoupling between TEP-C concentration and primary production. In 1999, the seasonal variation of primary production showed a large range of values throughout the

year, with maximum values in March and April and lower values in summer and fall, during the period where TEPs were most abundant. During summer, the low nitrate concentrations limit the phytoplanktonic biomass production, but net carbon uptake continues and is channelled into the production of transparent exopolymer products.

This study suggests that TEP may represent a significant carbon fraction, at the coastal site and offshore, at least during non-bloom conditions. The accumulation

Table 1. Particulate organic carbon (POC), dissolved organic carbon (DOC), organic carbon due to phytoplankton (C-Phyto) and carbon contained in TEP (TEP-C) at the DYFAMED and Point B sites, from February 1999 to February 2000. The fraction of TEP-C was compared to total organic carbon (TOC). TOC was calculated from the sum of POC and DOC. Organic carbon due to phytoplankton was calculated using a C:chl a ratio of 45, with chl a data from JGOFS and SOMLIT databases (1999 to 2000). All data were from the depth of the chlorophyll maximum (DCM) in order to allow comparisons

	POC ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	DOC ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	C-Phyto ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	C-Phyto ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	TEP-C ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	TEP-C ($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	TEP-C:TOC %	
Location	DYFAMED	DYFAMED	DYFAMED	Point B	DYFAMED	Point B		
Source	JGOFS Data base	Avril (2002)	Present study	Present study	Mari et al. (2001)	Present study	Present study	Present study
Month								
Feb	3.70	77.5	3.24		2.96		4	
Mar	7.5	78.5	5.42	1.94	3.56	13.09	4	15
Apr	7.4	84	3.23	2.20	3.90		4	
May	4.8	83	2.15	2.40		7.22		8
Jun	10.35	81	7.24	0.82	20.51	6.58	22	7
Jul	7.39	81.5	5.08	2.17	8.55	4.29	10	5
Aug	4.94	75	1.05	2.13	11.56	7.63	14	10
Sep		70	1.77	1.30	7.45	8.23		
Oct	5.95	70	1.31	0.98	1.94	3.68	3	5
Nov		82		0.72		3.99		
Dec		82	1.23	1.06	1.37	8.21		
Jan	6.35	77.5	2.09	1.40	0.64	2.04	1	2
Feb	7.13	78.5		2.03		1.99		2

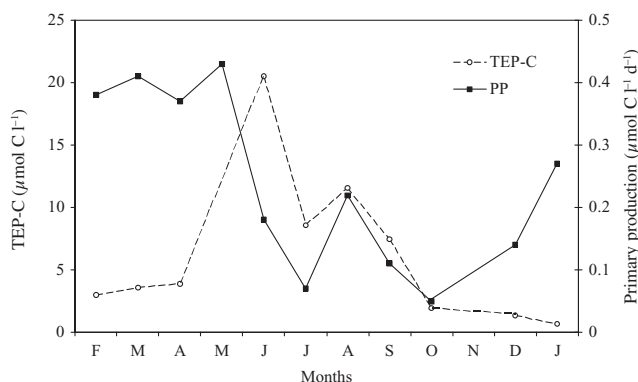


Fig. 9. Transparent exopolymeric-particle carbon (TEP-C) concentration and primary production at DYFAMED, from February 1999 to January 2000. Primary production data come from the depth of the chlorophyll maximum (DCM) layer as TEP measurements (DYFAMED-JGOFS-France)

of TEP observed at the DYFAMED station from mid-June to mid-September represented up to 22 % of the total organic carbon (TOC). The TEP-C concentration in summer is high compared to other sources of POM. At DYFAMED it correspond to 183 % of the total standing stock of POC (considering an average summer TEP-C concentration of $13 \pm 6 \mu\text{M}$). Since it is most unlikely that the TEP carbon concentration exceeds POC, it appears that either the TEP carbon content calculated from TEP produced in the laboratory overestimates the carbon content of naturally occurring TEP, or POC was underestimated. According to Engel & Passow (2001) the relationship between carbon and TEP is species-specific. Our estimates of carbon concentration of TEP derived from the theoretical size-relationships found by Mari (1999) calibrated from TEP produced in laboratory by coagulation of diatom exudates. It is likely that this equation is not adequate to estimate TEP-C content during summer in the NWM Sea, where groups other than diatoms represent a major part of the phytoplankton community (Marty et al. 2002).

Engel & Passow (2001) calculated the TEP-C concentration for various marine sites; for the northern Adriatic Sea, they reported TEP-C values to represent 103 % of measured POC. This authors suggested that some fraction of TEP is measured as DOC, because TEP cannot be retained quantitatively in GF/F filters. During summer at DYFAMED, the increase in TEP concentration is consistent with the accumulation of carbon-rich DOM (Avril 2001), some of which coagulates into TEP. TEP-C concentration corresponded to 25 % of the DOC; therefore, we can hypothesize that some varying fraction of TEP-C is also measured as DOC, which suggests that other processes could be involved in TEP dynamics. TEP are arbitrarily defined

as particulate matter since they are observed after filtration on $0.2 \mu\text{m}$ pore-sized filters. As they are formed abiotically by coagulation of high molecular weight DOM as colloids (Johnson et al. 1986, Chin et al. 1998, Passow 2000), TEP-C should not be partitioned between DOC and POC according to the traditional way of measuring those stocks. Colloids are highly abundant in seawater ($>10^7 \text{ ml}^{-1}$) and their phase is very dynamic, with high aggregation rates (Wells 1998). The polymer gelation theory suggests that there is a dynamic steady state between colloids and particle fractions, and that assembly kinetics is concentration-dependent (Chin et al. 1998). TEP may represent an important intermediary pool of organic matter in the ocean. The production of TEP could be an important pathway for the carbon overconsumption required in oligotrophic, nitrate-limiting waters and for the sequestration of dissolved organic carbon. This study constitutes a first attempt to estimate the significance of the TEP pool in relation to other organic pools in the field; new techniques will be necessary to better define this significance.

TEP dynamics in the NWM Sea

In the NWM Sea, the year can be separated into 2 distinct hydrological seasons: a mesotrophic period where strong winter vertical mixing brings nutrients from deep waters, allowing a winter-spring bloom in the surface (Minas et al. 1988); and an oligotrophic period, from spring to late summer, where the water column becomes stratified and depleted in nutrients (Béthoux et al. 1988).

The trophic status of the western Mediterranean Sea can also be assessed using the Fp-ratio. This ratio, described by Claustre (1994) as the ratio of large phytoplankton pigment biomass to the total pigment biomass, estimates the importance of new vs regenerated production and the linked phytoplankton community. In 1999, the mesotrophic regime corresponded to a high (80 %) Fp ratio at DYFAMED, which was associated with a large diatom bloom in March (the fucoxanthine concentration reached 100 mg m^{-2} when the average values for this area was 7.1 mg m^{-2} , Marty et al. 2002), and maximum values of DOC were observed (Avril 2002). High concentrations of TEP are often linked to diatom blooms (Passow & Alldredge 1994, Mari & Burd 1998, Passow et al. 2001); however, we observed low TEP concentrations shortly after the bloom, both in coastal and offshore stations. It is possible that TEP formed after the bloom coagulated with diatoms and rapidly sedimented. The high stickiness coefficient of TEP may facilitate the formation and sedimentation of fast-sinking aggregates during phyto-

plankton blooms (Passow et al. 1994, Logan et al. 1995), and the strong particulate flux observed during this period by Miquel & La Rosa (1999) at DYFAMED are linked to this sinking.

Oligotrophic conditions began at the end of spring, when the water column became stratified and the thermocline, at about 40 m depth in June, isolated superficial water from the rest of the water column, thus limiting vertical exchanges. During the stratified period, the Fp-ratio decreased to an average of 15 % and the late-spring bloom was dominated by nanoflagellates (Marty et al. 2002). The high TEP abundance observed in June at DYFAMED was linked to newly formed TEP during the bloom, and could be explained by phytoplankton activity (i.e. exudation of DOM from cells and subsequent coagulation). However, the build-up of a large pool of TEP in August was apparently not related to the nanoflagellate bloom; nevertheless, it coincided with the DOC accumulation observed in this region in summer (Copin-Montégut & Avril 1993, Avril 2002). From the spring bloom and during the summer season, phytoplankton and bacteria produce large amounts of C-rich DOM that is continuously accumulated in the surface layer, with a maximum of 82 μMC at 34 m depth in August and 90 μMC in September (Avril 2002). As the pool of TEP exhibits a seasonal pattern similar to that of dissolved organic matter, Mari et al. (2001) suggested that this C-rich pool is the origin of TEP.

The remaining questions are: Why is there a summer accumulation of TEP, and what are the consequences of this accumulation? The summer period is characterized by nutrient-depleted conditions in the surface layer that favour exopolymer production by phytoplankton (Obersonsterer & Herndl 1995). The transition to oligotrophic conditions corresponds to an increase in the relative contribution of flagellates and picoplankters (cyanobacteria and prochlorophytes) to the phytoplankton community, which exhibit low export rates (Marty et al. 2002). We hypothesize that TEP accumulation in the oligotrophic zone throughout summer is controlled by aggregation processes, which occur through higher production of photosynthetic extracellular products by small picoplankters, thus supporting regenerated production. During this period, the increase in the carbon assimilation rate is linked to the period of phosphorus limitation and abundance of cyanobacteria (Marty & Chierverini 2002), and TEP remain in the water column because of strong thermal stratification and lower summer turbulence, and the pycnocline represents a true barrier against sinking.

Stratification of a system changes the particle dynamics, increasing the number of larger particles and speeding up the onset of coagulation (Jackson 1990). As for the surface DOC-pool, which is consid-

ered labile and freshly produced, the residence time of TEP-pool in the water column would also depend on degradation, or not, by bacteria. In addition to the N-limited conditions which prevail in superficial waters during the spring and summer period, it has been shown that P is a limiting factor in the NWM Sea (Coste et al. 1988, Béthoux et al. 1998). This limitation is particularly important during the oligotrophic period, where the N:P ratio for superficial waters is always greater than 20 (Marty et al. 2002). Enrichment experiments in surface waters of the open NWM Sea (Sala et al. 2002, Van Wambeke et al. 2002) and at Point B (Zweifel et al. 1993, Thingstad et al. 1999, Hagström et al. 2001) showed that bacterial communities are P-limited during the stratified period. In batch cultures under P-limited conditions, the phytoplankton release dissolved monomeric and polymeric carbohydrates that are not consumed efficiently by heterotrophic bacteria (Obersonsterer & Hendl 1995). In the Mediterranean Sea, accumulation of degradable material in surface waters during summer can be explained by a malfunctioning of the microbial food web, with a restricted bacterial degradation of DOC due to a combination of P-limitation and predatory control (Thingstad & Rassoulzadegan 1995, Thingstad et al. 1997). Under P-limited conditions, heterotrophic bacteria will not be able to solubilize TEP, nor will they be able to metabolize the resulting organic dissolved carbon. During the stratified period in 1999 (from 0.05 to 0.10 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$), the lower bacterial production at DYFAMED in the surface layer, compared to bloom periods in March and June (from 0.15 to 0.30 $\mu\text{mol C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, Lemée et al. 2002), could explain such limitation.

Production of TEP and subsequent aggregation into larger particles could have some consequences for the flux of matter, but this depends on whether TEP settles faster than the rate of bacterial decomposition. From October, de-stratification leads to the mixing of superficial waters; during this period, Avril (2002) observed the transport of dissolved organic carbon by diffusion and downwelling. The low TEP abundance observed after summer could be attributed to those processes. Nevertheless, an increase in vertical flux due to TEP is not consistent with results of the vertical flux of particles observed at DYFAMED for this period. Indeed, Miquel & La Rosa (1999) showed that mass and carbon fluxes at 200 m were highest during winter and spring, and minimal during summer and autumn. However, the carbon fraction of sinking particles was maximal during summer/autumn, with a relatively high C:N ratio. If one considers the C:N ratio of POM collected at 200 m from sediment traps in October and November 1999 (10.7 and 7.6 respectively, J. C. Miquel pers. comm.), and assuming that non-TEP POM has a C:N value close to the Redfield ratio, this extra carbon

could be composed of TEP-like material, suggesting that TEP can act as important regulator of the C:N ratio of total organic matter.

Although TEP abundance followed **distinctly different** seasonal patterns at the coastal and offshore site, TEP formation and TEP-C content showed similar patterns at both sites of the NWM Sea. This leads us to conclude that TEP production is primarily governed by biological and chemical forcing: In the NWM Sea, the trophic status of the environment and the composition of primary producers control TEP formation and accumulation. Hydrological processes are also of primary importance, as they govern the seasonal TEP distribution.

Acknowledgements. We thank S. Dallot, J. Dolan and X. Mari for helpful comments, and DYFAMED observation service and INSU/CNRS SOMLIT for providing physical-chemical data. This work was supported by CNRS, INSU (ATI), the PROOF-DYFAMED programme (JGOFS, France) and EU Project NTAP (EVK3-CT-2000-00022) of the EU RTD Programme 'Environment and Sustainable Development'. It forms part of the ELOISE project cluster, and is Eloise Contribution No. xxx/xx.

LITERATURE CITED

- Allredge AL, Passow U, Logan BE (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res* 40:1131–1140
- Asper VL, Deuser WG, Knauer GA, Lorenz SE (1992) Rapid coupling of sinking particle fluxes between surface and deep ocean waters. *Nature* 357:670–672
- Avril B (2002) DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site). *Deep-Sea Res* 49:2163–2182
- Banse K (1994) Uptake of inorganic carbon and nitrate by marine plankton and the Redfield ratio. *Global Biogeochem Cycles* 8:81–84
- Béthoux JP (1989) Oxygen consumption, new production, vertical advection and environmental evolution in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res* 36:769–781
- Béthoux JP, Prieur L (1983) Hydrologie et circulation en Méditerranée Nord-Occidentale. *Pét Tech* 299:25–34
- Béthoux JP, Prieur L, Bong JH (1988) Le courant Ligure au large de Nice. *Oceanol Acta* 9:59–67
- Béthoux JP, Morin P, Chaumery C, Connan O, Gentili B, Ruiz-Pino D (1998) Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental changes. *Mar Chem* 63:155–169
- Carlson CA, Ducklow HW, Michaels AF (1994) Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature* 371:405–408
- Chin WC, Orellana MV, Verdugo P (1998) Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 391:568–572
- Claustre H (1994) The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures. *Limnol Oceanogr* 39:1206–1210
- Copin-Montégut C (2000) Consumption and production on scales of a few days of inorganic carbon, nitrate and oxygen by the planktonic community: results of continuous measurements at the Dyfamed Station in the northwestern Mediterranean Sea (May 1995). *Deep-Sea Res* 47:447–477
- Copin-Montégut G, Avril B (1993) Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the north-western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res* 40:1963–1972
- Corzo A, Morillo JA, Rodriguez S (2000) Production of transparent exopolymeric particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquat Microb Ecol* 23:63–72
- Coste B, Le Corre P, Minas HJ (1988) Re-evaluation of the nutrient exchanges in the Strait of Gibraltar. *Deep-Sea Res* 35:767–775
- Dandonneau Y, Le Bouteillier A (1992) A simple and rapid device for measuring planktonic primary production by *in situ* sampling, and ^{14}C injection and incubation. *Deep-Sea Res* 39:795–803
- Engel A (2002) Direct relationship between CO_2 uptake and transparent exopolymeric particles production in natural phytoplankton. *J Plankton Res* 24:49–53
- Engel A, Passow U (2001) Carbon and nitrogen content of transparent exopolymeric particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Mar Ecol Prog Ser* 219:1–10
- Engel A, Goldthwait S, Passow U, Alldredge A (2002) Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnol Oceanogr* 47:753–761
- Fowler SW, Knauer GA (1986) Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. *Prog Oceanogr* 16:147–194
- Garcia CM, Prieto L, Vargas M, Echevarria F, Garcia-Lafuente J, Ruiz J, Rubin JP (2002) Hydrodynamics and the spatial distribution of plankton and TEP in the Gulf of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *J Plankton Res* 24:817–833
- Grossart H, Simon M, Logan BE (1997) Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: the significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnol Oceanogr* 42:1651–1659
- Grossart HP, Berman T, Simon M, Pohlman K (1998) Occurrence and microbial dynamics of macroscopic organic aggregates (lake snow) in Lake Kinneret, Israel, in fall. *Aquat Microb Ecol* 14:59–67
- Hagström A, Pinhassi J, Zweifel UI (2001) Marine bacterioplankton show burst or rapid growth induced by substrate shifts. *Aquat Microb Ecol* 24:109–115
- Hewes CD, Holm-Hansen O (1983) A method for recovering nanoplankton from filters for identification with the microscope: the filter-transfer-freeze (FTF) technique. *Limnol Oceanogr* 28 (2):389–394
- Jackson GA (1990) A model of the formation of marine algal flocs by physical coagulation processes. *Deep-Sea Res* 37:1197–1211
- Johnson BD, Zhou X, Wangersky PI (1986) Surface coagulation in sea water. *Neth J Sea Res* 20:201–210
- Kjørboe T, Hansen LS (1993) Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *J Plankton Res* 15:993–1018
- Körtzinger A, Hedges JL, Quay PD (2001) Redfield ratios revisited: removing the biasing effect of anthropogenic CO_2 . *Limnol Oceanogr* 46:964–970
- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay MD, Rinaldi P, Gattuso JP (2002) Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 29:227–237
- Logan BE, Grossart HP, Simon M (1994) Direct observation of phytoplankton, TEP and aggregates on polycarbonate filters using brightfield microscopy. *J Plankton Res* 16:

- 1811–1815
- Logan BE, Passow U, Alldredge AL, Grossart HP, Simon M (1995) Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Res* 42: 203–214
- Mac Cave IN (1984) Size spectra and aggregation of suspended particles in the deep sea. *Deep-Sea Res* 31: 329–352
- Marchal O, Monfray P, Bates NR (1996) Spring-summer imbalance of dissolved inorganic carbon in the mixed layer of the northwestern Sargasso Sea. *Tellus* 48:115–134
- Mari X (1999) Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Mar Ecol Prog Ser* 183:59–71
- Mari X, Burd A (1998) Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Mar Ecol Prog Ser* 163:63–76
- Mari X, Kiorboe T (1996) Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *J Plankton Res* 18: 969–986
- Mari X, Beauvais S, Lemée R, Pedrotti ML (2001) Non-Redfield C:N ratio of transparent exopolymeric particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr* 46: 1831–1836
- Marty JC, Chiaverini J (2002) Seasonal and interannual variations in phytoplankton production at DYFAMED time-series station, northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res* 49:2017–2030
- Marty JC, Chiaverini J, Pizay MD, Avril B (2002) Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean sea at the DYFAMED time-series station (1991–1999). *Deep-Sea Res* 49:1965–1985
- Minas H, Minas M, Coste B, Gostan J, Nival P, Bonin MC (1988) Production de base et de recyclage; une revue de la problématique en méditerranée. *Oceanol Acta* 9:155–162
- Miquel JC, La Rosa M (1999) Suivi à long terme des flux particulaires au site DYFAMED (Mer Ligure, Méditerranée occidentale). *Océanis* 25(2):303–308
- Miquel J, Fowler S, La Rosa J, Buat-Menard P (1994) Dynamics of the downward flux of particles and carbon in the open northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res* 41: 243–261
- Mopper K, Zhou J, Ramana KS, Passow U, Dam HG, Drapeau DT (1995) The role of surface-active carbohydrates in the flocculation of a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res* 42:47–73
- Moutin T, Raimbault P, Poggiale JC (1999) Primary production in surface waters of the western Mediterranean sea. Calculation of daily production. *CR Acad Sci Paris, Life Sciences* 322:651–659
- Myklestad S (1977) Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N:P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Biol Ecol* 29: 161–179
- Nival P, Corre MC (1976) Variations annuelles des caractéristiques hydrologiques de surface dans la rade de Villefranche-sur-mer. *Ann Inst Oceanogr* 52:57–78
- Obernosterer I, Herndl GJ (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar Ecol Prog Ser* 116:247–257
- Parker CB, Diboll AG (1966) Alcian stains for histochemical localization of acid and sulfated polysaccharides in algae. *Phycologia* 6:38–46
- Passow U (2002a) Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog Oceanogr* 55:287–333
- Passow U (2002b) Production of transparent exopolymeric particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 236:1–12
- Passow U (2000) Formation of transparent exopolymeric particles, TEP, from dissolved precursor material. *Mar Ecol Prog Ser* 192:1–11
- Passow U, Alldredge AL (1994) Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 113:185–198
- Passow U, Alldredge AL (1995) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymeric particles (TEP). *Limnol Oceanogr* 40:1326–1335
- Passow U, Alldredge AL (1999) Do transparent exopolymeric particles (TEP) inhibit grazing by the euphausiid *Euphausia pacifica*? *J Plankton Res* 21:2203–2217
- Passow U, Shipe RF, Murray A, Pak DK, Brzezinski MA, Alldredge AL (2001) The origin of transparent exopolymeric particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Cont Shelf Res* 21:327–346
- Penna A, Berlutti S, Penna N, Magnani M (1999) Influence of nutrient ratios on the *in vitro* extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *J Plankton Res* 21:1681–1690
- Ramaiah N, Yoshikawa TKF, Furuya K (2001) Temporal variations in transparent exopolymeric particles (TEP) associated with a diatom spring bloom in a subarctic ria in Japan. *Mar Ecol Prog Ser* 212:79–88
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN (ed) *Vol 2. John Wiley & Sons*, p 26–77
- Sala MM, Peters F, Gasol JM, Pedros-Alio C, Marrasé C, Vagué D (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aquat Microb Ecol* 27:47–56
- Sambrotto RN, Savidge G, Robinson C, Boyd P and 6 others (1993) Elevated consumption of carbon relative to nitrogen in the surface ocean. *Nature* 363:248–250
- Schuster S, Herndl GJ (1995) Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 124:227–236
- Sharp JH, Benner R, Bennet L, Carlson CA, Fitzwater SE, Peltzer EP, Tupas LM (1995) Analyses of dissolved organic carbon in seawater: the JGOFS EqPac methods comparison. *Mar Chem* 48:91–108
- Sheldon RW, Prakash A, Sutcliffe WH Jr (1972) The size distribution of particles in the ocean. *Limnol Oceanogr* 17: 327–340
- Smetacek VS (1985) Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Mar Biol* 84:239–251
- Sournia A, Brylinski JM, Dallot S, Le Corre P, Leveau M, Prieur L, Forget C (1990) Fronts hydrologiques au large des côtes françaises: les sites ateliers du programme Frontal. *Oceanol Acta* 9:119–131
- Thingstad TF, Rassoulzadegan F (1995) Nutrient limitations, microbial food webs, and 'biological C-pumps': suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 117:299–306
- Thingstad TF, Hagström Å, Rassoulzadegan F (1997) Accumulation of degradable DOC in surface waters: is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnol Oceanogr* 42:398–404

- Thingstad TF, Pérez M, Pelegri S, Dolan J, Rassoulzadegan F (1999) Trophic control of bacterial growth in microcosms containing a natural community from northwest Mediterranean surface waters. *Aquat Microb Ecol* 18:145–156
- Toggweiler JR (1993) Carbon overconsumption. *Nature* 363: 210–211
- Tréguer P, Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'AutoAnalyzer Technicon), 2nd edn. *Univ de Bretagne Occidentale*
- Van Wambeke F, Christaki U, Giannakourou A, Moutin T, Souvemerzoglou K (2002) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 43:119–133
- Vidussi F, Claustre H, Bustillos-Guzman J, Cailliau C, Marty J (1996) Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from

- divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from luthein. *J Plankton Res* 18:2377–2382
- Wells ML (1998) Marine colloids—a neglected dimension. *Nature* 391:530–531
- Williams PJL (1995) Evidence for the seasonal accumulation of carbon-rich dissolved organic material, its scale in comparison with changes in particulate material and the consequential effect on net C:N assimilation ratios. *Mar Chem* 51:17–29
- Zhou J, Mopper K, Passow U (1998) The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnol Oceanogr* 43:1860–1871
- Zweifel UI, Norrman B, Hagström A (1993) Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Mar Ecol Prog Ser* 101:23–32

*Editorial responsibility: Otto Kinne (Editor),
Oldendorf/Luhe, Germany*

*Submitted: December 12, 2002; Accepted: August 19, 2003
Proofs received from author(s): ♦*